

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. Oktober 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/076927 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07C 231/02,
C07K 1/08

MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/03153

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. März 2002 (21.03.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Angaben zur Priorität:
101 15 213.2 28. März 2001 (28.03.2001) DE
101 26 431.3 31. Mai 2001 (31.05.2001) DE
101 57 882.2 26. November 2001 (26.11.2001) DE

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die
folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA,
ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];
51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RUDOLPH, Joachim
[DE/US]; 308 North River Street, Guilford, CT 06437
(US). JUNG, Günther [DE/DE]; Ob der Grafenhalde
5, 72076 Tübingen (DE). THERN, Bernd [DE/DE];
Ludwigstr. 4, 72072 Tübingen (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGE-
SELLSCHAFT; 51368 Leverkusen (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF CARBOXYLIC ACID AMIDES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON CARBONSÄUREAMIDEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of carboxylic acid amides, especially peptides, from an acid component in the form of a compound having at least one carboxy group and an amine component in the form of a compound having at least one primary or secondary amino group. The invention also relates to the utilization of said carboxylic acid amides.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Carbonsäureamiden, insbesondere Peptiden, aus einer Säure-Komponente in Form einer mindestens eine Carboxy-Gruppe aufweisenden Verbindung und einer Amin-Komponente in Form einer mindestens eine primäre oder sekundäre Amino-Gruppe aufweisenden Verbindung sowie dessen Verwendung.

WO 02/076927 A2

Verfahren zur Herstellung von Carbonsäureamiden

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Carbonsäureamiden, insbesondere Peptiden.

5

Carbonsäureamide werden üblicherweise durch Knüpfung einer Amidbindung CO–N zwischen der Carbonyl-Gruppe einer **Säure-Komponente**, z.B. einer Carbonsäure, und dem Stickstoff-Atom einer **Amin-Komponente**, z.B. einem primären oder sekundären Amin, hergestellt. Diese Bindungsknüpfung wird auch als Kondensation, im Folgenden aber als **Kupplung** bezeichnet.

10

Von besonderer Bedeutung ist die Kupplung für die **Peptid-Synthese**. Das Ziel der Peptid-Synthese ist der Aufbau von Peptiden aus Aminosäuren derart, dass genau die gewünschte Reihenfolge der Aminosäure-Bausteine eingehalten wird, eine möglichst hohe Ausbeute (Effizienz) erzielt und **Epimerisierungen** – bzw. Racemisierungen im Falle nur eines vorhandenen asymmetrischen Kohlenstoff-Atoms – während der Reaktion weitgehend oder vollständig vermieden werden zugunsten einer höheren Produktreinheit.

15

Am Anfang steht die Synthese von Dipeptiden, wobei wie in allen folgenden Schritten darauf zu achten ist, dass von den beiden funktionellen Gruppen der Aminosäuren (bzw. der Peptide) jeweils nur die eine in Reaktion tritt. Durch Blockierung der jeweils anderen Gruppen mittels **Schutzgruppen**, im Folgenden symbolisch als PG'' und PG' dargestellt, erreicht man so, dass die Acylierung der freien Amino-Gruppe einer Aminosäure der allgemeinen Formel AS, HN(R')-CH(R)-COOH, (R, R' = H, optional substituierte Alkyl- oder Aryl-Gruppe; z.B. AS = Tryptophan, Lysin, Asparagin, Serin, etc.) nur durch die Carboxy-Gruppe einer anderen Aminosäure stattfinden kann. Erster Schritt der Peptid-Synthese ist demnach die Synthese der partiell geschützten Aminosäuren 1, PG''-N(R''')-CH(R'')-COOH, und 2, HN(R')-CH(R)-CO-PG'.

20

25

30

- 2 -

Diese werden im zweiten Schritt, dem **Kupplungsschritt**, miteinander in Reaktion gebracht, wozu jedoch eine Aktivierung der Carboxy-Gruppe erforderlich ist. Dazu überführt man diese üblicherweise zunächst in einem vorgeschalteten **Aktivierungsschritt** mit **Aktivierungsreagenzien** intermediär in eine labile und besonders reaktionsfähige Form, meist eine elektronenarme Spezies wie ein Anhydrid, Ester oder Halogenid. Dadurch wird nucleophile Angriff der Amin-Komponente 1 begünstigt.

Die Umsetzung der partiell geschützten, aktivierten Komponenten 1 und 2 im Kupplungsschritt in Gegenwart von Kupplungsreagenzien (Kondensationsreagenzien) führt schließlich zum gewünschten Dipeptid $PG''-N(R''')-CH(R'')-CO-N(R')-CH(R)-CO-PG'$.

Der dritte Schritt der Peptid-Synthese besteht in der Abspaltung der Schutzgruppen, wofür sich spezifische Reagenzien eingeführt haben, z.B. die Behandlung mit Halogenwasserstoffsäuren und/oder Trifluoressigsäure im Fall von PG'' -Schutzgruppen wie der Benzyloxycarbonyl- ($PG'' = Cbz$), der tert.-Butoxycarbonyl- (Boc), der Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl- (Fmoc), der Triphenylmethyl- (Trt) oder der Nitrobenzolsulfonyl-Gruppe (Nps). Die PG' -Schutzgruppen der Carboxy-Gruppe, z.B. Methyl-, Ethyl-, Benzyl-, 4-Nitrobenzyl- und tert.-Butylester, werden ähnlich sowie durch alkalische Verseifung abgespalten.

Das nach Entfernung einer oder beider Schutzgruppen isolierbare Dipeptid kann in analog durchzuführenden Reaktionsschritten als Basis für die Synthese höherer (längerer) Peptide eingesetzt werden. Je nach Struktur des Peptids kann es jedoch vorteilhafter sein Segmentkupplungen anzuwenden, z.B. ein Dodecapeptid – statt konsekutiv in 11 Kupplungsschritten – durch Verknüpfung dreier Tetrapeptide herzustellen, oder sogar erforderlich sein, spezielle Synthese-Strategien zu entwickeln.

Die meisten Peptid-Synthesen werden als Festphasen-Synthesen durchgeführt. Unter **Festphasen-Synthese** bzw. **Festphasen-Technik** versteht man Arbeitsweisen, bei

denen mindestens ein Reaktionspartner – im Falle der Peptid-Synthese die Säure- oder Amin-Komponente, z.B. eine Aminosäure oder ein Peptid – in festphasengebundener Form vorliegt. Dies geschieht durch Immobilisierung des Reaktionspartners auf geeigneten Trägern wie Kunstharzen verschiedener Zusammensetzung.

5 Dabei kann entweder die Carboxy-Gruppe der Aminosäure bzw. des Carboxy-Terminus (kurz: C-Terminus/-terminal) des Peptids oder die Amino-Gruppe der Aminosäure bzw. des Amino-Terminus (kurz: N-Terminus/-terminal) des Peptids am Träger fixiert werden. Die Dosierung, Wiederaufbereitung und Abtrennung von Reaktionsprodukten wird erheblich erleichtert. Die bekannteste Festphasen-Peptid-

10 Synthese ist die von Merrifield eingeführte und inzwischen weitgehend automatisierte Merrifield-Technik.

Bei der Festphasen-Synthese wird üblicherweise die C-terminale Aminosäureeinheit des zu synthetisierenden Peptids über seine Carboxy-Gruppe an den unlöslichen

15 Träger geknüpft. Alle funktionellen Gruppen der Aminosäure-Seitenketten müssen mit permanenten Schutzgruppen versehen werden, die gegenüber den Reaktionsbedingungen der nachfolgenden Kupplungen stabil sind. Die temporäre Schutzgruppe, die die α -Aminogruppe während der Beladung des Trägers zunächst maskiert, wird anschließend entfernt. Ein Überschuss einer zweiten Aminosäure wird eingebracht,

20 wobei die Carboxy-Gruppe dieser Aminosäure mit einem Aktivierungsreagenz für die Amidbindungsbildung aktiviert wird. Im Anschluss an die Kupplung wird der Überschuss an Reagenzien durch einen Waschprozess entfernt und die Schutzgruppe des N-Terminus des Dipeptids abgespalten, bevor die dritte Aminosäure zugegeben wird. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis die gewünschte Peptidsequenz

25 zusammengesetzt ist. In einem letzten Schritt wird das Peptid vom Träger abgespalten und die Seitenketten-Schutzgruppen werden entfernt. Im allgemeinen werden die Beschaffenheit der Seitenketten und die Immobilisierung so aufeinander abgestimmt, dass die Schutzgruppenabspaltung und die Freisetzung des Peptids von der Festphase in einem Schritt vorgenommen werden kann.

Neben der Festphasen-Technik nimmt der Verzicht auf die Immobilisierung und Übergang über heterogene Gemische wie Dispersionen, insbesondere Suspensionen, bis zur homogenen Phase oder die Kombination von Fest- und Flüssigphasen-Technik zu.

5

Als Aktivierungsreagenzien haben sich bei der Kupplung von Aminosäuren 1 und 2 mit $R' = R'' = H$ neben klassischen Reagenzien zur Bildung von Säurechloriden, gemischten Anhydriden, Pentafluorophenylestern etc. Kombinationen aus verschiedenen substituierten Carbodiimiden, z.B. DCC (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid), DIC (Diisopropylcarbodiimid) oder EDC (N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-HCl), und einem Benzotriazol wie HOBT (1-Hydroxybenzotriazol) oder Aza-
10 benzotriazol wie HOAt (7-Aza-1-hydroxybenzotriazol) bewährt.

Für die speziellen Aktivierungsreagenz-Kombinationen DCC/HOAt und DIC/HOAt
15 ist bekannt, dass die Verwendung einer schwachen Base wie Collidin für die Aktivierung der Säure-Komponente und der Zusatz einer stärkeren Base beim Kupplungsschritt unter Umständen die Effizienz und Geschwindigkeit der Gesamtreaktion erheblich verbessern kann (L. A. Carpino, A. El-Faham, *Tetrahedron* 1999, 55, 6813-6830).

20

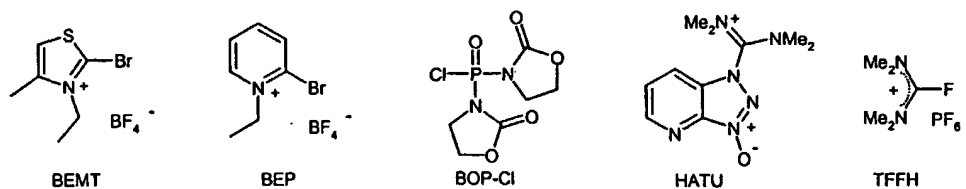
Die Ausbeute der Kupplung gewinnt mit zunehmender Länge (Höhe) des herzustellenden Peptids erheblich an Bedeutung. So bedeutet eine **Kupplungsausbeute** von 95 % je Kupplung für die Herstellung eines Pentapeptids, ausgehend von einer ersten Aminosäure, nach 4 Kupplungen eine Ausbeute von 81 %, bezogen auf die
25 erste Aminosäure. Bei der Herstellung eines Decapeptids beträgt die Ausbeute nach 9 Kupplungen dagegen nur noch 63 %.

Geringe Kupplungsausbeuten treten meist dann auf, wenn **sterisch gehinderte Aminosäuren** die Kupplung erschweren. Das ist beispielsweise der Fall bei Amino-
30 säuren mit raumerfüllenden Seitenketten, z.B. Valin (AS: R = iso-Propyl) oder

- 5 -

Isoleucin (AS: R = *sek*-Butyl), oder bei *N*-Alkylaminosäuren, d. h. Aminosäuren mit *N*-Alkylgruppen, z.B. *N*-Methylaminosäuren (AS: R' = Me).

- N*-Alkylaminosäuren sind Bestandteil einer Vielzahl biologisch aktiver Peptide (J. M. Humphrey, A. R. Chamberlin, *Chem. Rev.* 1997, 97, 2243-2266). Obwohl zahlreiche hochaktive Aktivierungsreagenzien wie die von HOBt oder HOAt abgeleiteten Iminium- bzw. Uroniumsalze, z.B. BOP-Cl oder das teure HATU, bekannt sind, ist bisher noch kein Durchbruch für das Problem der Festphasen-Kupplung sterisch gehinderter *N*-Alkylaminosäuren gelungen. Aus diesem Grund war man bisher auf eine Umgehung dieses Problems durch Anwendung von Segmentkupplungen und selektiver Methylierung am Harz angewiesen, z.B. bei der Totalsynthese des Cyclopeptids Cyclosporin A, bei dem 7 von insgesamt 11 Amidbindungen methyliert sind ((a) R. M. Wenger, *Helv. Chim. Acta* 1983, 66, 2672; (b) W. J. Colucci, R. D. Tung, J. A. Petri, D. A. Rich, *J. Org. Chem.* 1990, 55, 2895; (c) P. Raman, S. S. Stokes, Y. M. Angell, G. R. Flentke, D. A. Rich, *J. Org. Chem.* 1998, 63, 5734-5735).

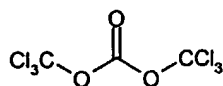


- Von Li *et al.* wurden die Aktivierungsreagenzien BEMT und BEP und deren Einsatz in der Totalsynthese von Cyclosporin O beschrieben ((a) P. Li, J. Cheng Xu, *Tetrahedron Lett.* 1999, 40, 8301-8304; (b) P. Li, J. Cheng Xu, *Chem. Lett.* 2000, 204-205; (c) P. Li, J. Cheng Xu, *J. Org. Chem.* 2000, 65, 2951-2958). Bei ihrem Einsatz als Festphasen-Aktivierungsreagenz sind BEMT und BEP dem Reagenz HATU deutlich überlegen, jedoch nach wie vor nicht effizient genug für den Einsatz in der Festphasen-Kupplung *N*-methylierter Aminosäuren. Speziell für den Fall der Kupplung zweier *N*-Methylaminosäuren mit sperrigen Seitenketten, z.B. Fmoc-

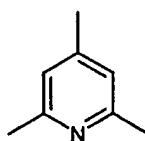
- 6 -

MeVal-OH an MeVal-Peptidyl-Harz, sind die Ausbeuten eigenen Versuchen zufolge mit weniger als 30 % generell niedrig.

5 Aus WO 00/02898 ist eine Verfahren zur Peptid-Synthese mit dem Aktivierungsreagenz Triphosgen und Collidin bekannt, welches bei der Kupplung von *N*-Methylaminosäuren mit sperrigen Seitenketten höhere Kupplungsausbeuten als HATU, BOP-Cl, TFFH oder andere Reagenzien erbringt (E. Falb, T. Yechezkel, Y. Salitra, C. Gilon, *J. Peptide Res.* 1999, 53, 507-517).



Triphosgen



2,4,6-Collidin

10

Die Kupplung von Fmoc-geschützten Aminosäuren an *N*-Alkyl-Aminosäuren, die an einen Peptidyl-Rinkamid-Harzrest gebunden sind, geschieht dabei folgendermaßen: Eine Fmoc-geschützte Aminosäure wird mit 1,65 eq. (eq. = Stoffmengen-Äquivalent) 15 Triphosgen und 14 eq. Collidin in THF umgesetzt und nach 1 min Aktivierungszeit 1 h bei 50°C mit der am Peptidyl-Harz-Rest gebundenen Aminosäure zur Reaktion gebracht.

Auch dieses Verfahren weist eine Reihe von Nachteilen auf. Die Kupplung sterisch 20 gehinderter *N*-Methylaminosäuren gelingt zwar gut, die für die Synthese höherer Peptide essentiellen Kupplungsausbeuten von über 90 % können jedoch nicht erreicht werden. Die erforderliche hohe Reaktionstemperatur ist für die Festphasen-Synthese unpraktisch und führt in erhöhtem Maße zu Nebenreaktionen. Das verwendete Rink-Amid-Harz benötigt stark saure Abspaltungsbedingungen, welche 25 im Fall von vielfach *N*-methylierten Peptiden bekanntermaßen zur Zersetzung führen (J. Urban, T. Vaisar, R. Shen, M. S. Lee, *Int. J. Peptide Protein Res.* 1996, 47, 182-189).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein Verfahren zur Herstellung von Carbonsäureamiden bereitzustellen, das die Kupplung sterisch gehinderter Aminosäuren in hohen Ausbeuten ermöglicht.

5

Gelöst wird die Aufgabe durch ein spezielles Aktivierungsreagenz in Kombination mit dem Einsatz von bestimmten Basen sowohl zusammen mit der Säure-Komponente im Aktivierungsschritt als auch zusammen mit der Amin-Komponente für den Kupplungsschritt.

10

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Carbonsäureamiden, insbesondere Peptiden, aus einer Säure-Komponente in Form einer mindestens eine Carboxy-Gruppe aufweisenden Verbindung und einer Amin-Komponente in Form einer mindestens eine primäre oder sekundäre Amino-Gruppe aufweisenden Verbindung, bei dem

15

- (i) die Amin-Komponente zusammen mit einer Kupplungsbase in Form einer organischen Base mit mindestens einem Stickstoffatom in einem Lösungsmittel vorgelegt wird,

20

- (ii) die Säure-Komponente mit einem Aktivierungsreagenz in Form eines Carbonats der Formel I,



25

das die beiden gleichen oder verschiedenen, getrennten oder miteinander verbundenen, elektronenziehenden Gruppen X aufweist,

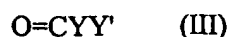
dessen Monohalogenids der Formel II,

30



in der X die gleiche Bedeutung wie in Formel I hat und Y für ein Halogenatom steht,

5 oder dessen Dihalogenids der Formel III,



in der Y und Y' unabhängig voneinander für je ein Halogenatom stehen,

10

und einer Aktivierungsbase in Form einer organischen Base mit mindestens einem Stickstoffatom in ein Lösungsmittel gegeben wird,

(iii) das die Säure-Komponente enthaltende Gemisch gemäß (ii) zu dem die
15 Amin-Komponente enthaltenden Gemisch gemäß (i) gegeben wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist hocheffizient und ermöglicht Kupplungen, die mit den bisher bekannten Verfahren nur in sehr geringen Ausbeuten abliefen und daher insbesondere für die Festphasen-Synthese von Peptiden ungeeignet waren. Damit
20 ist erstmals eine effiziente Fest- und Flüssigphasen-Synthese von den in der Natur vielfach vorkommenden Peptiden mit *N*-alkylierten und sterisch gehinderten Aminosäuren möglich. Das Verfahren ist einfach durchführbar, die Reaktion läuft sehr schnell ab und ist auch bei hoher sterischer Hinderung komplett epimerisierungsfrei. Auch kann auf das schädliche Erhitzen bei der Reaktionsdurchführung verzichtet
25 werden. Weiterhin erlaubt es den Einsatz billiger Kupplungsreagenzien wie Triphosgen, während die meisten der bekannten modernen Aktivierungsreagenzien sehr teuer sind. Damit eignet sich das Verfahren auch aus wirtschaftlicher Sicht universell zur Knüpfung von Amidbindungen an der Festphase wie auch in Flüssigphase bzw. Lösung, und zwar insbesondere in Fällen, bei denen die herkömmlichen Ver-
30 fahren zur Knüpfung von Amidbindungen nicht effizient genug sind.

Das vorliegende Verfahren bietet sich speziell für die Herstellung zahlreicher biologisch aktiver *N*-Alkylamide an, deren Herstellung oft problematisch ist und teure Reagenzien benötigt. Ebenso bietet sich das vorliegende Verfahren für die Herstellung zahlreicher *N*-methylierter cyclopeptidischer biologisch aktiver Naturstoffe, z.B. Cyclosporine, Tentoxine, Dolastatine, Jaspamide, Didemnide, Nodularine und eine Reihe weiterer Vertreter an (J. M. Humphrey, A. R. Chamberlin, *Chem. Rev.* 1997, 97, 2243-2266). Weiterhin kann es für ein Funktionalitätsscreening von Peptiden genutzt werden, indem – zur gezielten Unterbindung bestimmter Wasserstoffbrücken – anstelle normaler nicht-*N*-alkylsubstituierter Aminosäuren *N*-Methylaminosäuren eingebaut werden. *N*-Methylpeptide sind zudem hydrophober und stabiler gegenüber proteolytischen Enzymen, was ihre Bioverfügbarkeit und ihr therapeutisches Potential verbessern kann.

Die Säure-Komponente und/oder die Amin-Komponente ist vorzugsweise eine Aminosäure oder ein Peptid, deren übrige Carboxy- und/oder Amino-Gruppen geschützt sind.

Die Säure-Komponente und die Amin-Komponente werden üblicherweise in einem Verhältnis, bezogen auf die Stoffmenge, von mindestens 1 zu 1, vorzugsweise von 1 zu 1 bis 10 zu 1, insbesondere von 1 zu 1 bis 5 zu 1, eingesetzt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens sind entweder die Säure-Komponente und die Amin-Komponente gleiche oder verschiedene Aminosäuren oder ist die Säure-Komponente eine Aminosäure und die Amin-Komponente ein Peptid oder ist die Amin-Komponente eine Aminosäure und die Säure-Komponente ein Peptid, wobei über die mindestens eine Carboxy-Gruppe und die mindestens eine primäre oder sekundäre Amino-Gruppe hinaus vorhandene weitere Carboxy- bzw. primäre oder sekundäre Amino-Gruppen geschützt sind.

Hierbei ist es besonders bevorzugt, dass die Amino-Gruppe der Amin-Komponente eine sekundäre Amino-Gruppe und/oder die an das α -C-Atom der Säure-Komponente

gebundene Aminogruppe eine sekundäre Amino-Gruppe ist, insbesondere die Amino-Gruppe der Amin-Komponente und die geschützte oder peptidisch verknüpfte Aminogruppe der Säure-Komponente beide *N*-alkyliert sind, vorzugsweise unabhängig voneinander *N*-alkyliert mit einer Methyl-, Ethyl-, Propyl-, iso-Propyl-,
5 Cyclohexyl- oder Benzylgruppe oder mit einer dieser Gruppen, die mit einer oder mehreren Amino- und/oder Carboxygruppen substituiert ist, wobei diese Amino- bzw. Carboxygruppen ihrerseits durch entsprechende Schutzgruppen geschützt sind.

Bei dem Aktivierungsreagenz in Form eines Carbonats der Formel I stellt die Einheit
10 $(-OX)_2$ im Falle getrennter elektronenziehender Gruppen X zwei getrennte Gruppen $-OX$ dar, während sie im Falle miteinander verbundener elektronenziehender Gruppen X eine Einheit $-OX-XO-$ darstellt, beispielsweise bei einem 1,3-Dioxolan-2-enderivat.

15 Als Aktivierungsreagenz wird üblicherweise eingesetzt ein Carbonat der Formel I, in der eine oder beide Gruppen X unabhängig voneinander für eine Gruppe $CH_{3-n}Y_n$ stehen, wobei n für eine der Zahlen 1, 2 oder 3 und Y_n für ein, zwei oder drei gleiche oder verschiedene Halogenatome steht, stehen, oder ein halogeniertes 1,3-Dioxolan-2-enderivat, dessen vier Wasserstoffatome in 4- und 5-Position ganz oder teil-
20 weise durch ein, zwei, drei oder vier gleiche oder verschiedene Halogenatome substituiert sind, oder ein Monohalogenid der Formel II, in der X für eine Gruppe $CH_{3-n}Y_n$ steht, wobei n für eine der Zahlen 1, 2 oder 3 und Y_n für ein, zwei oder drei gleiche oder verschiedene Halogenatome steht, stehen, oder ein Dihalogenid der Formel III.

25 Bevorzugte Halogenatome sind dabei Fluor, Chlor und Brom, insbesondere Chlor, wobei im Falle von zwei oder drei an ein Kohlenstoffatom gebundenen Halogenatomen diese vorzugsweise gleich sind. Dementsprechend stehen die Gruppen X in Formeln I bzw. II unabhängig voneinander insbesondere für eine der Gruppen CCl_3 , CF_3 , CBr_3 , $CHCl_2$, CHF_2 , $CHBr_2$, CHI_2 , CH_2Cl , CH_2F oder CH_2Br und sind bevor-
30 zugte Dihalogenide der Formel III $O=CF_2$, $O=CCl_2$ (Phosgen) und $O=CBr_2$.

Vorzugsweise wird als Aktivierungsreagenz Triphosgen ($\text{O}=\text{C}(-\text{OCCl}_3)_2$, Bis-(Trichlormethyl)-carbonat, BTC), Diphosgen ($\text{O}=\text{C}(-\text{OCCl}_3)\text{Cl}$), Phosgen ($\text{O}=\text{CCl}_2$) und/oder 4,4,5,5-Tetrachlor-1,3-dioxolan-2-on und besonders bevorzugt Triphosgen eingesetzt.

5

Die Säure-Komponente und das Aktivierungsreagenz werden üblicherweise in einem Verhältnis, bezogen auf die Stoffmenge, von mindestens 1 zu 1, vorzugsweise von 1 zu 1 bis 4 zu 1, insbesondere von 2 zu 1 bis 3 zu 1, eingesetzt. Bei dem Einsatz von Triphosgen als Aktivierungsreagenz ist ein Verhältnis von 3:1, bei Diphosgen von 10 2:1 und bei Phosgen und halogenierten Dioxolanonen von 1:1 besonders bevorzugt.

Die Kupplungsbase und die Aktivierungsbase werden üblicherweise unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe umfassend Pyridin und die ein- oder mehrfach alkylsubstituierten Pyridinderivate, vorzugsweise aus den Collidinen, 2,4,6- 15 Tritert-butylpyridin, 2,6-Ditert-butylpyridin, 2,6-Ditert-butyl-4-methylpyridin, 2,6-Dimethylpyridin, 2,3,5,6-Tetramethylpyridin, 2-Methylpyridin und Pyridin, oder aus der Gruppe der Trialkylamine, vorzugsweise aus Diisopropylethylamin (DIEA), Triisopropylamin, *N*-Methylmorpholin, Triethylamin. Die Collidine sind die verschiedenen Trimethylpyridine und Ethylmethylpyridine, beispielsweise 2,3,5- 20 Collidin und insbesondere 2,4,6-Collidin. Genauso können Mischungen von zwei oder mehr Basen eingesetzt werden.

Die Kupplungseffizienz läßt sich durch die gezielte Auswahl von Kupplungs- und/oder Aktivierungsbase steigern. In einer bevorzugten Ausführungsform des Ver- 25 fahrens ist die zusammen mit der Amin-Komponente eingesetzte Kupplungsbase 2,4,6-Collidin, Pyridin, Triethylamin oder ein sterisch gehindertes Trialkylamin, vorzugsweise ein sterisch gehindertes Trialkylamin, insbesondere Diisopropylethylamin oder Triisopropylamin, besonders bevorzugt Diisopropylethylamin. In einer ebenfalls bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens ist die zusammen mit der Säure- 30 Komponente eingesetzte Aktivierungsbase ein sterisch gehindertes ein- oder mehrfach alkylsubstituiertes Pyridinderivat, vorzugsweise 2,4,6-Collidin, 2,4,6-Tritert-

butylpyridin, 2,6-Ditert-butylpyridin, 2,6-Ditert-butyl-4-methylpyridin, 2,6-Dimethylpyridin oder 2,3,5,6-Tetramethylpyridin, besonders bevorzugt 2,4,6-Collidin.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens werden die beiden vorstehenden bevorzugten Ausführungsform miteinander kombiniert. Dabei fällt die Steigerung der Kupplungseffizienz besonders hoch aus, wenn mit dem sterisch gehinderten Pyridinderivat, vorzugsweise 2,4,6-Collidin oder 2,4,6-Tri-tert-butylpyridin, insbesondere 2,4,6-Collidin, als Aktivierungsbase ein sterisch gehindertes Trialkylamin, insbesondere DIEA, als Kupplungsbase kombiniert wird. 2,4,6-Tri-
10 tert-butylpyridin steigert die Kupplungseffizienz in der Regel weniger als 2,4,6-Collidin, ergibt jedoch während der Aktivierung in THF eine homogene Lösung.

Die Kupplungsbase und/oder die Aktivierungsbase werden üblicherweise in einem Verhältnis zur Amin-Komponente, bezogen auf die Stoffmenge, von mindestens 2 zu
15 1, vorzugsweise von 4 zu 1 bis 30 zu 1, insbesondere von 8 zu 1 bis 20 zu 1, besonders bevorzugt von 12 zu 1 bis 16 zu 1, eingesetzt.

Die Lösungsmittel gemäß (i) und (ii) sind unabhängig voneinander ausgewählt aus den bei den Verfahrensbedingungen flüssigen organischen und anorganischen
20 Lösungsmittel, üblicherweise aus Tetrahydrofuran, 1,4-Dioxan, Tetrahydropyran, Ethylenglykoldimethylether, Diethylenglykoldimethylether, Trichlormethan, 1,3-Dichlorpropan, 1,2-Dichlorethan, Nitromethan oder ein Gemisch zweier oder mehrerer davon, vorzugsweise Tetrahydrofuran, 1,4-Dioxan, Tetrahydropyran, Ethylenglykoldimethylether oder Diethylenglykoldimethylether oder ein Gemisch zweier oder
25 mehrerer davon, insbesondere Tetrahydrofuran.

Besonders bevorzugt sind die Lösungsmittel gemäß (i) und (ii) identisch.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird als Kupplungsbase DIEA, als Aktivierungsreagenz Triphosgen, als Aktivierungsbase 2,4,6-Collidin und als Lösungsmittel jeweils Tetrahydrofuran (THF) eingesetzt, insbe-
30

- 13 -

sondere, bezogen auf die Amin-Komponente, 8 eq. DIEA, 1,15 eq. Triphosgen und 10 eq. 2,4,6-Collidin. Die Säurekomponente wird dabei vorzugsweise in einem Verhältnis, bezogen auf die Stoffmenge an Triphosgen, von 3 zu 1 eingesetzt, d. h., bezogen auf die Amin-Komponente, etwa 3,5 eq. der Säurekomponente.

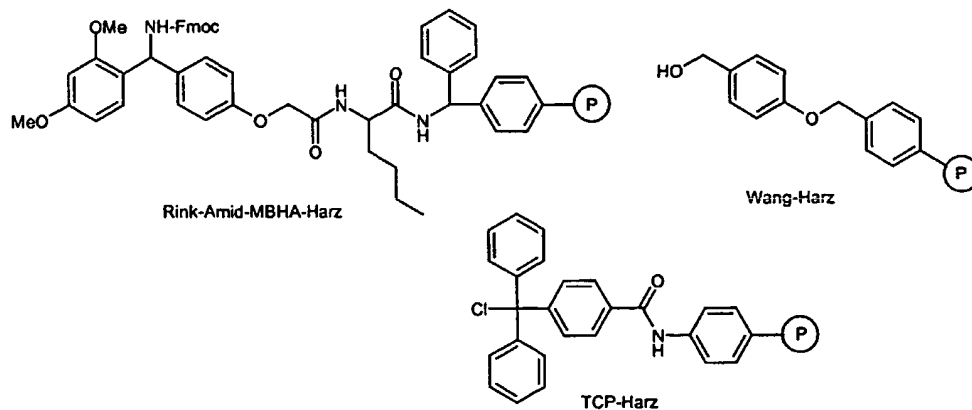
5

Das Verfahren wird üblicherweise bei einer Temperatur von 15 bis 30°C, bevorzugt von 18 bis 25°C, insbesondere von 20 bis 22°C, durchgeführt. Nach (ii) 3 min ausreichend, vorzugsweise 10 s bis 2 min, insbesondere 30 s bis 1 min. Nach der Zugabe gemäß (iii) läßt man vorzugsweise für eine Dauer von 5 min bis 4 h reagieren. Dabei wird üblicherweise geschüttelt oder gerührt.

10

In einer besonderen Ausführungsform des Verfahrens ist die Amin-Komponente oder die Säure-Komponente reversibel an eine feste Phase gebunden, vorzugsweise an ein Harz, insbesondere an ein Tritylharz, Wang-Polystyrol-Harz oder Rink-Amid-MBHA-Harz und besonders bevorzugt an TCP-Harz:

15



Die auf einer Benzylalkohol-Trägerung basierenden Wang-Harze und Sasrin-Harze sind für die Kupplung sterisch gehinderter Aminosäuren weniger geeignet, da auf der Dipeptidstufe eine sehr hohe Tendenz zur Bildung von Diketopiperazinen auftreten kann, was mit hohen Ausbeuteverlusten verbunden ist.

20

Besonders geeignet für den sequentiellen Aufbau von *N*-Methylpeptiden ist das TCP (Tritylchlorid-Polystyrol)-Harz, ein von der Firma PepChem Goldammer & Clausen (D-72076 Tübingen) erhältliches Tritylharz. Das TCP-Harz ist ein hervorragend ausgewogenes Harz, was die Stabilität und Abspaltbarkeit betrifft, und verhindert durch den sperrigen Trityl-Linker die Diketopiperazin-Bildung auf der Dipeptidstufe. Das TCP-Harz ist vorzugsweise wie das von der Firma PepChem Goldammer & Clausen erhältliche Handelsprodukt kaum oder sogar gar nicht mit Friedel-Crafts-Nebenprodukten verunreinigt, die sich bei Festphasen-Synthesen als problematisch erweisen können.

10

Das erfindungsgemäße Verfahren ist in idealer Weise für die Anknüpfung einer *N*-methylierten Fmoc-geschützten Aminosäure an eine *N*-methylierte oder nicht-methylierte Aminogruppe eines Peptidyl-Harzes geeignet.

15

Bei der Durchführung des Verfahrens als Flüssigphasen-Synthese wird bei der Aktivierung vorzugsweise mindestens die doppelte Menge *N*-geschützte Aminosäure, bezogen auf die Stoffmenge an Aktivierungsreagenz, eingesetzt, um zu verhindern, dass nicht umgesetztes Aktivierungsreagenz gegebenenfalls einen zersetzenden Einfluss auf die Kupplungsreaktion nehmen kann.

20

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Flüssigphasen-Synthese werden, bezogen auf die Stoffmenge an Amin-Komponente,

(i) 1 eq. Amin-Komponente, insbesondere Carboxy-geschützte Aminosäure oder Peptid, zusammen mit einer Kupplungsbase, insbesondere DIEA, in einem Lösungsmittel, insbesondere THF, vorgelegt wird,

25

(ii) 1,1 eq. Säure-Komponente, insbesondere Fmoc-geschützte Aminosäure, mit einem Aktivierungsreagenz, insbesondere Triphosgen, und einer Aktivierungsbase, insbesondere 2,4,6-Collidin, in ein Lösungsmittel, insbesondere THF, gegeben wird,

30

(iii) das die Säure-Komponente enthaltende Gemisch gemäß (ii) zu dem die Amin-Komponente enthaltenden Gemisch gemäß (i) gegeben,

5 wobei Kupplungsbase und Aktivierungsbase in einer Menge von mindestens 2 eq., vorzugsweise von 4 bis 30 eq., insbesondere von 8 bis 20 eq., besonders bevorzugt von 12 bis 16 eq., beispielsweise von 14 eq., eingesetzt werden.

10 Die Flüssigphasen-Synthese verläuft auch in sterisch stark gehinderten Fällen, z.B. der Kupplung von MeVal mit MeVal, extrem schnell, in hohen Ausbeuten und epimerisierungsfrei.

Das vorliegende Verfahren eignet sich zur Automatisierung, beispielsweise in einem Peptidsynthesizer.

Beispiele**Beispiel 1** Festphasen-Kupplungen mit Triphosgen

5 Ausgehend von den am Harz gebundenen N-methylierten Aminosäuren MeIle (Ile = L-Isoleucin) bzw. MeLeu (Leu = L-Leucin) wurden das permethylierte Pentapeptid MeVal-MeVal-Sar-MeVal-MeIle (Val = L-Valin, Sar = L-Sarcosin) bzw. das permethylierte Tetrapeptid MeLeu-MeLeu-MeVal-MeLeu durch vier bzw. drei Kupplungen hergestellt und dabei in einer Produktreinheit von über 98 % erhalten.

10

Bezogen auf die am Harz vorhandenen Aminofunktionen wurde bei jeder Kupplung mit folgenden Überschüssen gearbeitet (eq. = Stoffmengen-Äquivalent):

	Fmoc-Aminosäure:	5 eq.
	Triphosgen:	1,65 eq.
15	Collidin:	14 eq.
	DIEA:	14 eq.

Die Konzentration der Reaktionslösung wurde, bezogen auf die Fmoc-Aminosäure auf 0,14 mol/l eingestellt. Dazu wurde Triphosgen als Stammlösung in wasserfreiem Tetrahydrofuran (THF(abs)) hergestellt, indem 13,7 mg Triphosgen pro 1 ml THF(abs) gelöst wurden. Von dieser Lösung wurden pro mmol Fmoc-Aminosäure 7,14 ml benötigt.

20

Vorgehensweise: Das getrocknete, vorbelegte Harz (TCP-Harz von der Firma PepChem, Belegung ca. 0,4 mmol Amin-Komponente pro g Harz) wurde in einer Kunststoffspritze mit Kunststofffritte und Verschlußstopfen mit DIEA/THF(abs) vorbehandelt. Dazu wurden je 100 mg Harz, 100 µl THF(abs) und 100 µl DIEA zum Harz gegeben. Die Vorquellzeit bis zur Zugabe der weiteren Reagenzien betrug zwischen 5 und 10 min.

30

Die Fmoc-Aminosäure (5 eq.) wurde in in einem Polypropylen-Röhrchen mit Deckel in der Triphosgen/THF-Stammlösung (1,65 eq. Triphosgen / 7,14 ml pro mmol

Aminosäure) unter Umschwenken gelöst. Sobald die Aminosäure vollständig gelöst war, wurde 2,4,6-Collidin (14 eq. / 371 µl pro mmol Aminosäure) oder 2,4,6-Tri-tert-butylpyridin (14 eq.) zugegeben, wobei es im Fall von Collidin zu der Bildung eines farblosen Niederschlags kam. Die Mischung wurde für etwa 30 bis 60 s umgeschwenkt, um alle Reagenzien zu durchmischen und die Aminosäure zu aktivieren. Dann wurde die Suspension mit einer Pasteurpipette auf das vorgequollene Harz gegeben. Die Spritze wurde verschlossen und auf einem Schüttler für 5 bis 30 min bei 20°C geschüttelt. Danach wurde das Harz nacheinander mit THF, Methanol (MeOH), Dimethylformamid (DMF), MeOH, Dichlormethan (DCM), MeOH jeweils 3 mal gewaschen.

Beispiel 2

Zur Veranschaulichung der Leistungsfähigkeit des Verfahrens wurde folgende Modellkupplung unter Verwendung dreier verschiedener Kupplungsverfahren (HATU/DIEA/DCM, BEMT/DIEA/DCM und Triphosgen/Collidin/ DIEA/THF) durchgeführt. Als Modellsystem wurde die Kupplung zweier sterisch gehinderter *N*-methylierter Aminosäuren (MeVal) gewählt, wobei das als Amin-Komponente dienende MeVal als Bestandteil des Tripeptids MeVal-Melle-Sar am Harz (P) gebunden war. Als Säure-Komponente wurden jeweils 5 eq. Fmoc-MeVal verwendet und die Reaktion jeweils nach 30 min abgebrochen.

Im Schlüsselschritt wurden die folgenden drei verschiedenen Kupplungsbedingungen angewendet:

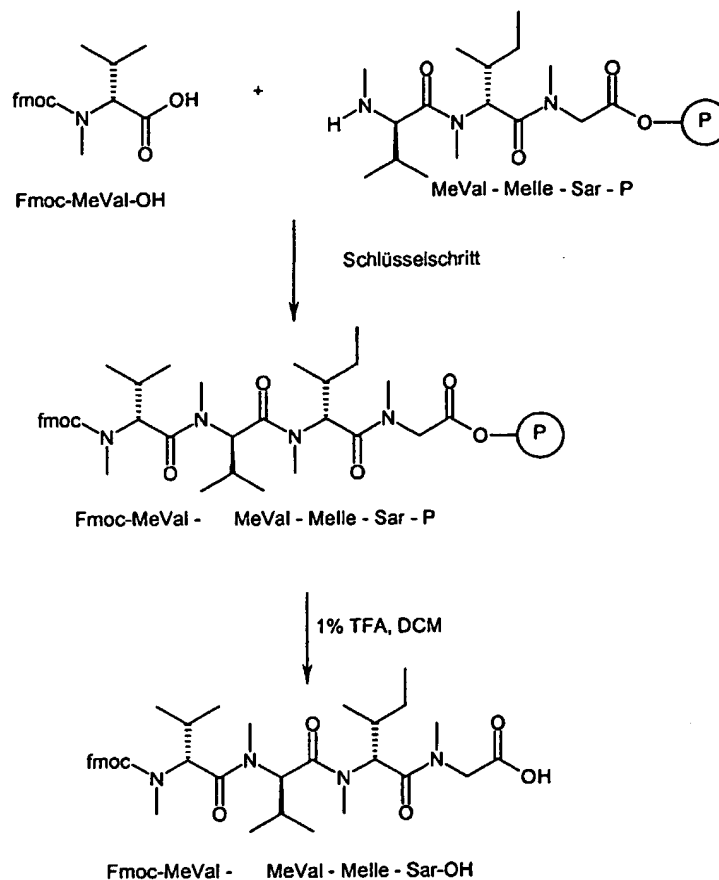
25

- 1) HATU/DIEA/DCM, 30 min.
- 2) BEMT/DIEA/DCM, 30 min.
- 3) Triphosgen/Collidin/DIEA/THF, 30 min.

30

Anschließend wurde das Dipeptid mit 1 %iger Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan (DCM) vom Harz abgespalten.

- 18 -



Wie anhand der HPLC-Chromatogramme der Rohprodukte (Fig. 1) ersichtlich ist, führt das üblicherweise für Problemkupplungen eingesetzte Reagenz HATU im gezeigten Fall zu keinerlei Umsatz, auch mit BEMT ist der Umsatz unbefriedigend. Demgegenüber ist bei Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens bereits nach 30 min ein hoher Umsatz erreicht. Wiederholung dieser Kupplung unter den gleichen Bedingungen führt zu quantitativer Produktbildung. Im vorliegenden Fall konnte explizit nachgewiesen werden, dass keine Epimerisierung stattfindet, d.h. es wird ausschließlich das Per-L-Tetrapeptid gebildet (siehe Beispiel 3).

Fig. 1: HPLC-Chromatogramme der Reaktionsprodukte der drei Umsetzungen unter verschiedenen Bedingungen (UV-Detektion, $\lambda = 214$ nm). Die Kurven für die Um-

setzungen mit BEMT und Triphosgen sind perspektivisch versetzt dargestellt (d.h. die Grundlinie aller drei Kurven beginnt bei 0 AU).

Beispiel 3

5

Um herauszufinden, ob bei der Modellkupplung von Beispiel 2 Epimerisierung eingetreten ist, wurde ein 50:50-Gemisch von L- und D-FmocMeVal mit dem Tripeptid gekuppelt, das erhaltene Gemisch der beiden diastereomeren Tetrapeptide, DLLL- und LLLL-Isomer, mittels RP-HPLC (Reverse Phase-High Pressure Liquid
10 Chromatography) getrennt und mittels UV-Detektion das Chromatogramm des Diastereomerengemischs aufgezeichnet (Fig. 2). Unter den gleichen RP-HPLC-Bedingungen wurden auch die HPLC-Chromatogramme (UV-Detektion) des isolierten DLLL-Isomers (Fig. 3) und des Produktes der Kupplung von reinem L-FmocMeVal (Fig. 4) aufgezeichnet. Im letzteren Fall wurde ausschließlich das Signal
15 des LLLL-Diastereomers gefunden (Fig. 4), d.h. es trat keine Epimerisierung auf.

Fig. 2: RP-HPLC-Chromatogramm eines Gemischs aus DLLL- und LLLL-Isomer (mAU = 10^{-3} Absorptionseinheiten).

20

Fig. 3: RP-HPLC-Chromatogramm des DLLL-Isomers.

Fig. 4: RP-HPLC-Chromatogramm des LLLL-Isomers.

A) Beispiel 4: Flüssigphasen-Synthese eines Dipeptids

25

Die geschützten *N*-Methyl-L-aminosäuren FmocMeVal-OH und MeVal-OBn wurden zum Dipeptid FmocMeVal-MeVal-Obn gekuppelt.

30

Dazu wurden 1,1 eq. der Fmoc-Aminosäure in THF in Gegenwart von 14 eq. 2,4,6-Collidin mit 0,5 eq. Triphosgen versetzt und die entstandene Aktivierungslösung in

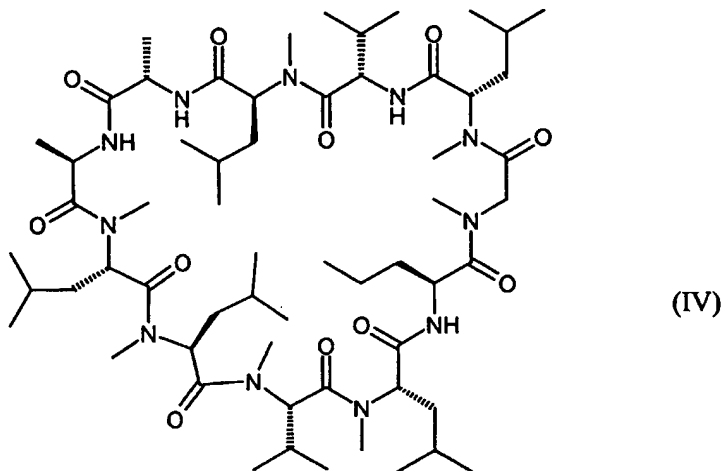
- 20 -

die Lösung von 1 eq. der Carboxy-geschützten Aminosäure und 14 eq. DIEA in THF gegeben.

Die Reaktion benötigte 5 min zur vollständigen Umsetzung. Es traten weder Neben-
5 produkte auf noch fand Epimerisierung statt.

Beispiel 5 Synthese von Cyclosporin O

Zunächst wurde als Vorstufe das lineare Undecapeptid mit der Sequenz
10 H-Nva-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeLeu-(TCP-Harz)
am TCP-Harz aufgebaut und dieses nach der Abspaltung vom Harz zum Cyclosporin
15 O (IV) cyclisiert.



1) Aufbau der linearen Undecapeptid-Vorstufe:

20 Die Belegung von 150 mg TCP-Harz erfolgte mit 55 mg Fmoc-MeLeu-OH (3 eq) in 77 µl DCM mit 3 eq DIEA über 3 Stunden.

Anschließend wurde das Undecapeptid mit zehn Kupplungen aufgebaut. Nach jeder Kupplung wurde der Chloranil-Test oder der Kaiser-Test durchgeführt (Fmoc Solid Phase Synthesis, W. C. Chan, P. D. White (Hrsg.), Oxford University Press, 2000, S. 61ff.). Im Falle eines negativen Testergebnisses wurde erneut gekuppelt.

5

In Ergänzung zu erfindungsgemäßen Kupplungen mit Triphosgen als Aktivierungsreagenz wurden an speziellen Syntheseabschnitten zusätzlich Kupplungen mit der Aktivierungsreagenz-Kombination aus Diisopropylcarbodiimid (DIC) und Hydroxyazabenzotriazol (HOAt) durchgeführt. Der Einsatz dieser Reagenzien erfolgte in der folgenden Weise: 3 eq. der *N*-geschützten Aminosäure wurden jeweils in einer Lösung von 3 eq. HOAt und 3 eq. DIEA in CH₂Cl₂ gelöst. Zu dieser Lösung wurden 3 eq. DIC gegeben. Nach 5- bis 10-minütiger Voraktivierung wurde die Reaktionslösung zum Peptidylharz gegeben. Die Reaktionszeit betrug jeweils 12 Stunden. Die Kupplungen mit Triphosgen wurden wie Beispiel 1 beschrieben durchgeführt, wobei die Reaktionszeit jeweils 2,5 oder 3 Stunden betrug.

15

Die Kupplungen wurden im Einzelnen wie folgt durchgeführt, wobei unter anderem das Aktivierungsreagenz und die Reaktionszeit in Stunden angegeben ist:

20

- 1.) MeVal → MeLeu-(TCP-Harz): Triphosgen, 3 h:
IR-Kontrolle zeigt Fmoc-Bande, Chloranil-Test positiv
→ erneute Kupplung über die Triphosgen, 3 h:
Chloranil-Test negativ

25

- 2.) MeLeu → MeVal: Triphosgen, 3 h:
Chloranil-Test negativ, HPLC: 100 % Fläche Produktpeak

- 3.) MeLeu → MeLeu: Triphosgen, 3 h:
Chloranil-Test negativ, HPLC: 99 % Fläche Produktpeak

30

- 4.) D-Ala → MeLeu: Triphosgen, 3 h:
Chloranil-Test positiv, HPLC: 10 % Fläche Produktpeak
→ anschließende Kupplung mit HOAt/DIC, 12 h:
Chloranil-Test negativ, HPLC: 95 % Fläche Produktpeak
- 5
- 5.) Ala → D-Ala: Triphosgen, 3 h:
Kaiser-Test pos. HPLC: 80 % Fläche Produktpeak
→ anschließende Kupplung mit HOAt/DIC, 12 h:
Kaiser-Test negativ, HPLC: 98 % Fläche Produktpeak
- 10
- 6.) MeLeu → Ala: Triphosgen, 3 h:
Kaiser-Test negativ
- 7.) Val → MeLeu: Triphosgen, 3 h:
Chloranil-Test positiv, HPLC: 60 % Fläche Produktpeak
→ anschließende Kupplung mit HOAt/DIC, 12 h:
Chloranil-Test negativ
- 15
- 8.) MeLeu → Val: Triphosgen, 3 h:
Kaiser-Test negativ
- 20
- 9.) Sar → MeLeu: Triphosgen, 2,5 h:
Chloranil-Test negativ
- 25
- 10.) Nva → Sar: Triphosgen, 2,5 h:
Chloranil-Test negativ, HPLC: 96 % Fläche Produktpeak

Das Tetrapeptid Fmoc-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeLeu-OH wurde in einer Reinheit von über 99 % ausschließlich über erfindungsgemäße Kupplungen mit Triphosgen erhalten, die wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt wurden. Nur die erste

30

Kupplung musste dabei einmal wiederholt werden. Das HPLC-Spektrum des Tetrapeptids ist in Fig. 5 gezeigt.

5 Nach erfindungsgemäßer Kupplung des 5. Restes (Fmoc-D-Ala-OH) mit Triphosgen zeigte das HPLC nur 10 % Umsatz. Jedoch konnte die Reaktion durch zusätzlichen Einsatz von HOAt/DIC-Kupplung zu vollständigem Umsatz geführt werden.

10 Die zehnte Kupplung zeigt, dass auch die erfindungsgemäße Kupplung mit Triphosgen einer nicht *N*-methylierten Aminosäure auf eine *N*-methylierte nahezu quantitativ verlaufen kann.

15 Mit der Kombination aus erfindungsgemäßen Kupplungen mit Triphosgen und Kupplungen mit HOAt/DIC wurde die lineare ungeschützte Undecapeptid-Vorstufe des Cyclosporins in einer HPLC-Ausbeute von 90 % erhalten (HPLC-Spektrum: s. Fig. 6).

2) Cyclisierung und Reinigung

20 Für die Abspaltung des linearen Peptids vom Harz wurde Hexafluorisopropanol verwendet. Das Rohpeptid wurde nach Gefriertrocknung direkt und ohne weitere Aufarbeitung cyclisiert. Die Cyclisierung wurde in Dichlormethan mit HOAt, EDCI und DIEA über einen Zeitraum von 16 Stunden durchgeführt. Die Rohausbeute betrug ca. 75 bis 80 % (HPLC-Spektrum: s. Fig. 7).

25 3) Ausbeuteberechnung und Reinheitskontrolle

Die Belegung des Harzes mit der ersten Aminosäure betrug 0,4 mmol/g Harz. Es wurden 150 mg Harz eingesetzt, was einer Menge von 60 µmol Peptid am Harz entspricht (theoretische Ausbeute an linearer Vorstufe von Cyclosporin O (M =
30 1160,60) bei einem angenommenen Umsatz von 100 % pro Schritt: 69,6 mg). Nach

Durchführung der gesamten Sequenz wurde eine Ausbeute an linearem Rohprodukt ($M = 1178,62$) von 36,0 mg (30,5 μmol , 50,8 %) erhalten.

5 Anschließend wurden 10,0 mg (8,5 μmol) Rohprodukt cyclisiert. Die Ausbeute betrug 8,1 mg (7,0 μmol ; 82,4 %). Die Gesamtausbeute an Rohprodukt von Cyclosporin O beträgt damit 41,8 %.

10 Die erhaltenen 8,1 mg Rohprodukt wurden mittels präparativer HPLC gereinigt, wobei 2,9 mg (2,5 μmol ; 35,7 % des Rohproduktes) erhalten wurden. Die Gesamtausbeute bei der Herstellung von Cyclosporin in Bezug auf die erste Harzbeladung betrug damit 14,9 %.

15 Diese Ausbeute liegt innerhalb der Grenzen der meisten Flüssigphasen-Synthesen, die für verschiedene Cyclosporin-Analoga erhalten wurden. $^1\text{H-NMR}$ belegte die Identität des synthetischen Cyclosporin O mit dem Naturstoff. Es wurden keine Diastereomere gefunden. Das Massenspektrum des gereinigten Cyclosporin O ist in Fig. 8 gezeigt.

20 **Fig. 5:** HPLC-Chromatogramm des Fmoc-geschützten Tetrapeptids Fmoc-MeL-MeL-MeV-MeL-OH (UV-Detektion: $\lambda = 214 \text{ nm}$)

Fig. 6: HPLC-Chromatogramm des linearen entschützten Undecapeptides (UV-Detektion: $\lambda = 214 \text{ nm}$)

25 **Fig. 7:** HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts der Cyclisierungsreaktion zum Cyclosporin O (UV-Detektion: $\lambda = 214 \text{ nm}$).

Fig. 8: Massenspektrum des gereinigten Cyclosporin O.

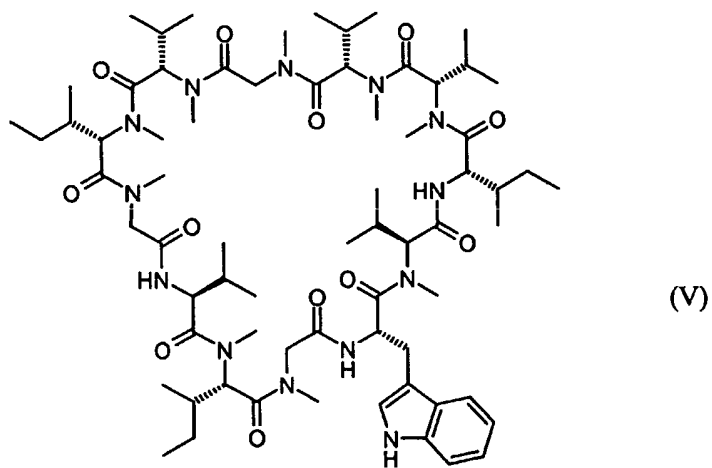
Beispiel 6 Synthese von Omphalotin A

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gelang erstmals die Totalsynthese von Omphalotin A. Omphalotin A ist ein Cyclododecapeptid mit einer hohen
5 nematiziden Wirkung, insbesondere gegen den wichtigen pflanzenpathogenen Nematoden *Meloidogyne incognita* (A. Mayer, H. Anke, O. Sterner, *Nat. Prod. Lett.* 1997, 10, 25-32; O. Sterner, W. Etzel, A. Mayer, H. Anke, *Nat. Prod. Lett.* 1997, 10, 33-38; WO 97/20857).

10 Zunächst wurde als Vorstufe das lineare Dodecapeptid mit der Sequenz

H-Sar-Val-Melle-Sar-Trp-MeVal-Ile-MeVal-MeVal-Sar-MeVal-Melle-(TCP-Harz)

am TCP-Harz aufgebaut und dieses nach der Abspaltung vom Harz zum Omphalotin
15 A (V) cyclisiert.



1) Aufbau der linearen Dodecapeptid-Vorstufe

Die Belegung von 2 g TCP-Harz erfolgte mit 733 mg Fmoc-Melle-OH (3 eq) in 15 mL DCM mit 1 mL DIEA (3 eq) über 3 Stunden. Es wurde eine Beladung von 0,56 mmol/g ermittelt.

Anschließend wurde das Dodecapeptid mit elf Kupplungen aufgebaut. Nach jeder Kupplung wurde der Chloranil-Test oder der Kaiser-Test durchgeführt (Fmoc Solid Phase Synthesis, W. C. Chan, P. D. White (Hrsg.), Oxford University Press, 2000, S. 61ff.). Im Falle eines negativen Testergebnisses wurde erneut gekuppelt. In Ergänzung zur erfindungsgemäßen Kupplung mit Triphosgen wurden an speziellen Syntheseabschnitten Kupplungen mit Diisopropylcarbodiimid (DIC) und Hydroxyazabenzotriazol (HOAt) durchgeführt. Der Einsatz dieser Reagenzien erfolgte in der folgenden Weise: 3 eq. der *N*-geschützten Aminosäure wurden in einer Lösung von 3 eq. HOAt und 3 eq. DIEA in CH₂Cl₂ gelöst. Zu dieser Lösung wurden 3 eq. DIC gegeben. Nach 5-10 min. Voraktivierung wurde die Reaktionslösung zum Peptidylharz gegeben (Reaktionszeiten wie angegeben).

Die Kupplungen wurden im Einzelnen wie folgt durchgeführt, wobei unter anderem das Aktivierungsreagenz und die Reaktionszeit in Stunden angegeben ist:

- 1.) Kupplung MeVal→Melle: Triphosgen (wie Beispiel 1), 2,5 h:
Chloranil-Test negativ.
- 2.) Kupplung Sar→ MeVal: Triphosgen (wie Beispiel 1), 4 h:
Chloranil-Test negativ
- 3.) Kupplung MeVal→ Sar: Triphosgen (wie Beispiel 1), 3 h:
Chloranil-Test negativ

- 27 -

- 4.) MeVal→ MeVal: Triphosgen (wie Beispiel 1), 3 h:
Chloranil-Test negativ, HPLC 96 % Fläche Produktpeak (nach Fmoc-Entschützung).
- 5 5.) Ile→ MeVal: HOAt/DIC, 16 h:
Chloranil-Test positiv, HPLC: ca. 80 % Fläche Produktpeak
→ Nachkupplung mit HOAt/DIC, 20 h:
Kaiser-Test negativ
- 10 6.) MeVal→ Ile: Triphosgen (wie Beispiel 1), 1 h:
Kaiser-Test negativ, HPLC: ca. 95 % Fläche Produktpeak.
- 7.) Trp→ MeVal: HOAt, 18 h:
Chloranil-Test minimal positiv, HPLC: ca. 93 % Fläche Produktpeak.
- 15 8.) Sar→ Trp: Triphosgen (wie Beispiel 1), 1 h:
Kaiser-Test negativ, HPLC: 93 % Fläche Produktpeak.
- 9.) MeIle→ Sar: Triphosgen (wie Beispiel 1), 1 h:
20 Chloranil-Test negativ, HPLC: 96 % Fläche Produktpeak.
- 10.) Val→ MeIle: HOAt/DIC, 16 h:
Chloranil-Test positiv, HPLC: 85 % Fläche Produktpeak,
→ Nachkupplung mit HOAt/DIC, 15 h:
25 Chloranil-Test negativ, HPLC: Fläche Produktpeak > 90% (Integration nicht möglich, da Peak am Anschlag des Detektors)
- 11.) Sar→ Val: Triphosgen (wie Beispiel 1), 1 h:
Kaiser-Test negativ, HPLC: 93 % Fläche Produktpeak.
- 30 (Alle HPLC-Reinheiten gelten für Fmoc-entschützte Peptide, $\lambda = 214 \text{ nm}$)

2) Cyclisierung und Reinigung

Für die Abspaltung des linearen Peptids vom Harz wurde Hexafluorisopropanol
5 verwendet. Das Rohpeptid (HPLC-Spektrum: s. Fig. 9, ESI-Massenspektrum: s. Fig.
10) wurde nach Gefriertrocknung direkt und ohne weitere Aufarbeitung cyclisiert. Es
wurden aus vier Festphasenläufen 1,29 g (0.965 mmol) Rohprodukt an linearem
Dodecapeptid für die Cyclisierung eingesetzt. Die Cyclisierung wurde in Dichlor-
methan mit HOAt, EDCI und DIEA über einen Zeitraum von 16 Stunden durch-
10 geführt. Die Rohausbeute betrug ca. 78 % (HPLC-Spektrum: s. Fig. 11).

3) Ausbeuteberechnung und Reinheitskontrolle

Die Belegung des Harzes mit der ersten Aminosäure betrug 0,56 mmol/g Harz. Es
15 wurden insgesamt 2,0 g Harz eingesetzt, was einer Menge von 1,12 mmol Peptid am
Harz entspricht (theoretische Ausbeute an linearer Vorstufe von Omphalotin A (M =
1318,77) bei einem angenommenen Umsatz von 100 % pro Schritt: 1,48 g). Nach
Durchführung der gesamten Sequenz wurde eine Ausbeute an linearem Rohprodukt
(M = 1336,78) von 1,336 g (1,0 mmol, 89,2 %) erhalten.

20 Anschließend wurden 1,29 g (0,965 mmol) Rohprodukt, aufgeteilt in vier gleich
große Ansätze, cyclisiert. Die Ausbeute betrug 1,11 g (0,842 mmol; 87,2 %). Die
Gesamtausbeute an Rohprodukt von Omphalotin A beträgt damit 77,8 %.

25 70 mg Rohprodukt wurden mittels präparativer HPLC gereinigt, wobei 24,5 mg
(18,6 µmol; 35,0 % des Rohproduktes) erhalten wurden (HPLC-Spektrum: s. Fig.
12). Die Gesamtausbeute bei der Herstellung von Omphalotin A in Bezug auf die
erste Harzbeladung betrug damit 27,2 %.

30 ¹H-NMR-Spektroskopie belegte die Identität des synthetischen Omphalotin A mit
dem Naturstoff (Fig. 13) (NMR-Daten publiziert in: O. Sterner, W. Etzel, A. Mayer,

H. Anke, *Nat. Prod. Lett.* 1997, 10, 33-38). Das Massenspektrum des gereinigten Omphalotin A ist in Fig. 14 gezeigt.

4) Racemisierungskontrolle von Omphalotin A (OmA)

5

Die Racemisierungstests wurden nach der Methode von König (W. König, I. Benecke, N. Lucht, E. Schmidt, J. Schulze, S. Sievers, *J. Chromatogr.* 1983, 279, 555-562) durchgeführt. Dazu wurde nach Totalhydrolyse des Peptids in DCI/D₂O mit Isopropylisocyanat derivatisiert und die Derivate auf einer chiralen GC-Phase mit
 10 GC/MS vermessen. Die Hydrolyse in deuteriertem Lösungsmittel erlaubt die Korrektur der Ergebnisse um den Anteil der Epimerisierung, der durch die Hydrolyse selbst verursacht wurde, da diese Derivate ein Deuteriumatom enthalten und aufgrund ihrer um 1 Da verschobenen Masse in der GC/MS-Analytik vernachlässigt werden können.

15

	<i>N</i> -Me-D-MeVal	<i>N</i> -Me-D-Melle	<i>N</i> -Me-D-Melle (Cyclisierungs- stelle)
Naturstoff	0,86 %	1,76 %	-
Lineares Dodekapeptid	0,66 %	0,97 %	-
OmA Rohprodukt	0,76 %	15,4 %	ca. 30 %
OmA aufgereinigt	0,31 %	6,9 %	ca. 14 %

Die Analyse der Epimerisierung des zeigt deutlich, dass die Kupplungsmethode an sich nahezu völlig racemisierungsfrei ist. Allerdings tritt während der Zyklisierung starke Epimerisierung ein. Das dabei entstehende falsche Diastereomer lässt sich
 20 säulenchromatographisch nicht vollständig abtrennen und verunreinigt dadurch das Endprodukt (vgl. HPLC-Chromatogramme Fig. 11 und 12, das falsche Diastereomer eluiert selbst bei isokratischem Lauf als Schulter kurz nach dem Omphalotin A).

Fig. 9: HPLC-Chromatogramm des linearen, entschützten Dodecapeptides (Rohprodukt nach Abspaltung vom Harz; Beispiel 6).

5 Fig. 10: ESI-Massenspektrum des linearen, entschützten Dodecapeptides (Rohprodukt nach Abspaltung vom Harz; Beispiel 6).

Fig. 11: HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts der Cyclisierungsreaktion (Beispiel 6).

10 Fig. 12: HPLC-Chromatogramm des gereinigten Endprodukts, Omphalotin A (Beispiel 6).

Fig. 13: ^1H -NMR-Spektrum (700 MHz, CD_3OD) des gereinigten Endprodukts, Omphalotin A (Beispiel 6).

15

Fig. 14: ESI-Massenspektrum des gereinigten Endprodukts, Omphalotin A (Beispiel 6).

Beispiel 7 Verbesserte Synthese von Omphalotin A (V)

20

Um das Problem der Epimerisierung der C-terminalen Aminosäure während der Cyclisierung zu vermeiden, wurde die optisch nicht aktive Aminosäure Fmoc-Sarcosin als erste Aminosäure auf das Trägerpolymer gekuppelt. Dazu wurden 200 mg TCP-Harz (Substitution 1,04 mmol/g) mit einer Lösung von 1 eq Fmoc-Sar-

25 OH und 3 eq DIEA in DCM(abs) versetzt und die Suspension für 3 h geschüttelt. Danach wurde zu der Suspension etwa 0,5 ml Methanol gegeben, um die verbliebenen Tritylchloridfunktionen als Methylether zu cappen. Eine Fmoc-Bestimmung ergab eine Belegung von 0,58 mmol/g. Unter Berücksichtigung des theoretischen Massenzuwachses des Harzes von ca. 40 mg bedeutet dies, dass auf

30 dem Syntheseharz 0,14 mmol Fmoc-Sarcosin immobilisiert waren. Bezogen auf

diese Stoffmenge wurden für die BTC-Kupplung folgende Reagenzienüberschüsse eingesetzt:

	Fmoc-Aminosäure:	3,5 eq
5	Triphosgen:	1,15 eq
	Collidin:	10,0 eq
	DIEA:	8,0 eq

Triphosgen wurde als Stammlösung mit einer Konzentration von 61,5 mmol/l hergestellt (entsprechend 18,27 mg BTC pro Milliliter THF(abs)), von der pro mmol Aminosäure 5,36 ml eingesetzt wurden. Daraus resultiert eine Aminosäurekonzentration von 0,19 mol/l.

Die grundsätzliche Vorgehensweise bei der Triphosgenkupplung ist bis auf zwei Ausnahmen analog zu Beispiel 6:

- 1.) Die Zugabe der nunmehr fast halbierten Menge an DIEA zum entschützten Peptidylharz erfolgte erst unmittelbar vor der Zugabe der Aktivierungslösung (Fmoc-Aminosäure, Triphosgen, Collidin in THF(abs)).
 - 2.) Die Fmoc-Entschützung des Peptidylharzes mit Piperidin wurde zeitlich so kurz wie möglich gehalten, d.h. das Fmoc-geschützte Harz wurde 1 x 3 min und 1 x 8 min mit 20% Piperidin/DMF behandelt.
- Beide genannten Maßnahmen sollten den Kontakt des Fmoc-entschützten Harzes mit Base minimieren, um einen basenkatalysierten nucleophilen Angriff des freien Aminoterminus an der Tritylesterbindung des Sarcosin und die daraus folgende zyklisierende Abspaltung zu unterbinden. Diese Nebenreaktion, die auf der Stufe des Dipeptides zur bereits erwähnten Bildung von Diketopiperazinen führt, ist vermutlich verantwortlich für das Scheitern früherer Syntheserversuche von Omphalotin A und

kürzerer Peptidsegmente mit Sarcosin als C-terminaler Aminosäure unter Anwendung der Triphosgenkupplung.

5 In einigen Fällen kam die Anwendung der HOAt-Kupplung zur Anwendung, die wie in Beispiel 6 durchgeführt wurde.

Weiterhin wurde in einigen Fällen die HATU-Kupplung verwendet. Bei dieser wurde wie folgt vorgegangen: Die zu kuppelnde Fmoc-Aminosäure (3,5 eq) wurde gemeinsam mit HATU (3,5 eq) eingewogen und in einer möglichst geringen Menge DCM(abs)/DMF(abs) (1:1) gelöst. Zu der Lösung wurde DIEA (7 eq) gegeben und 10 für 15 min zur Voraktivierung stehengelassen. Danach wurde diese Lösung direkt zu dem in DMF(abs) vorgequollenen, entschützten Peptidylharz gegeben und für die jeweils angegebene Zeit geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde abgesaugt und das Harz mit DMF, DCM, DMF, DCM, MeOH (jeweils 3x) gewaschen.

15 Die beschriebenen Änderungen ermöglichten die Synthese von optisch hochreinem Omphalotin A ausgehend von mit Fmoc-Sar belegtem TCP-Harz. Dabei wurde jedes der drei im Zielmolekül vorkommenden Sarcosine als C-terminale Aminosäure verwendet, was zu den folgenden drei unterschiedlichen linearen Vorläufermolekülen 20 führte:

- a.) H-Trp-MeVal-Ile-MeVal-MeVal-Sar-MeVal-Melle-Sar-Val-Melle-Sar-OH
- b.) H-Val-Melle-Sar-Trp-MeVal-Ile-MeVal-MeVal-Sar-MeVal-Melle-Sar-OH
- c.) H-MeVal-Melle-Sar-Val-Melle-Sar-Trp-MeVal-Ile-MeVal-MeVal-Sar-OH

25 Während die linearen Dodekapeptide in allen drei Fällen in sehr zufriedenstellenden Reinheiten anfielen, verlief die Zyklisierung nur in den Fällen a.) und b.) quantitativ; im Fall c.) waren im Endprodukt noch etwa 20 % des linearen Peptids vorhanden.

30 Exemplarisch soll hier die Synthesevariante über das lineare Dodekapeptid b.) gezeigt werden.

Syntheseverlauf:

- 1.) Kupplung MeIle -> Sar: Triphosgen, 3 h, Chloranil-Test negativ.
 - 2.) Kupplung MeVal -> MeIle: Triphosgen, 3 h, Chloranil-Test negativ.
 - 5 3.) Kupplung Sar -> MeVal: Triphosgen, 2,5 h, Chloranil-Test negativ.
 - 4.) Kupplung MeVal -> Sar: Triphosgen, 3 h, Chloranil-Test negativ.
HPLC-Reinheit: >98 %.
 - 5.) Kupplung MeVal -> MeVal: Triphosgen 3 h, Chloranil-Test schwach positiv
Nachkupplung Triphosgen 3 h, Chloranil-Test negativ. HPLC-Reinheit: > 95
10 %.
 - 6.) Kupplung Ile -> MeVal: HATU, 20 h, Chloranil-Test schwach positiv
Nachkupplung HATU 3 h, Chloranil-Test schwach positiv
Nachkupplung HOAt 16 h, Chloranil-Test negativ. HPLC-Reinheit: ca. 90 %.
 - 7.) Kupplung MeV ->Ile: Triphosgen, 3 h, HPLC-Reinheit: 90 %.
 - 15 8.) Kupplung Trp -> MeV: HATU 4 h, HPLC-Reinheit: 89 %.
 - 9.) Kupplung Sar -> Trp: Triphosgen, 4 h, HPLC-Reinheit: 86 %.
 - 10.) Kupplung MeIle -> Sar: Triphosgen, 4 h, HPLC-Reinheit: 83 %.
 - 11.) Kupplung Val -> MeIle: HATU, 5 h, HPLC-Reinheit: 80 %.
- 20 Alle angegebenen HPLC-Reinheiten beziehen sich auf das Fmoc-geschützte Peptid ($\lambda=214$ nm). Die verlängerten Reaktionszeiten der meisten BTC-Kupplungen resultieren in erster Linie aus der parallelen Reaktionsführung zur simultanen Synthese aller drei genannten linearen Vorläuferpeptide. Eine Verringerung der Kupplungseffizienz durch die Reduzierung der eingesetzten Reagenzienmengen wurde nicht
25 beobachtet.

Die Racemisierungskontrolle des gemäß Beispiel 7 synthetisierten Omphalotin A (OmA) erfolgte wie unter Beispiel 6 beschrieben.

	<i>N</i> -Me-D-MeVal	<i>N</i> -Me-D-Melle
Lineares Dodekapeptid	1,2 %	2,4 %
OmA Rohprodukt	1,5 %	3,2 %

Wie erwartet ist hier der Anteil an *N*-Me-D-Melle im zyklisierten Rohprodukt nicht deutlich erhöht gegenüber dem linearen Vorläuferpeptid, da es nicht an der Zyklisierungsreaktion beteiligt ist. Diese Werte und die Peakschärfe des Zyklisierungsproduktes in den HPLC-Chromatogrammen (Fig. 15 und 16) bedeuten, dass die Produktreinheit des gemäß Beispiel 7 synthetisierten Omphalotin A deutlich besser sein muss als die des gemäß Beispiel 6 erhaltenen Produkts. Das HPLC-Chromatogramm der aufgereinigten Verbindung (Fig 17) bestätigte dies. Eine Reinigung mittels präparativer HPLC lieferte das hochreine Produkt in einer Gesamtausbeute von 21 %.

Fig. 15: HPLC-Chromatogramm des Fmoc-entschützten, linearen Dodekapeptides (Beispiel 7).

Fig. 16: HPLC-Chromatogramm des Rohproduktes der Zyklisierungsreaktion (Beispiel 7).

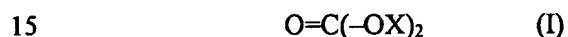
Fig. 17: HPLC-Chromatogramm des gereinigten, optisch reinen Omphalotin A (Beispiel 7).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Carbonsäureamiden aus einer Säure-Komponente in Form einer mindestens eine Carboxy-Gruppe aufweisenden Verbindung und einer Amin-Komponente in Form einer mindestens eine primäre oder sekundäre Amino-Gruppe aufweisenden Verbindung, bei dem

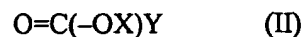
(i) die Amin-Komponente zusammen mit einer Kupplungsbase in Form einer organischen Base mit mindestens einem Stickstoffatom in einem Lösungsmittel vorgelegt wird,

(ii) die Säure-Komponente mit einem Aktivierungsreagenz in Form eines Carbonats der Formel I,



das die beiden gleichen oder verschiedenen, getrennten oder miteinander verbundenen, elektronenziehenden Gruppen X aufweist,

dessen Monohalogenids der Formel II,



in der X die gleiche Bedeutung wie in Formel I hat und Y für ein Halogenatom steht,

oder dessen Dihalogenids der Formel III,



in der Y und Y' unabhängig voneinander für je ein Halogenatom stehen,

und einer Aktivierungsbase in Form einer organischen Base mit mindestens einem Stickstoffatom in ein Lösungsmittel gegeben wird,

(iii) das die Säure-Komponente enthaltende Gemisch gemäß (ii) zu dem die Amin-Komponente enthaltenden Gemisch gemäß (i) gegeben wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Säure-Komponente und/oder die Amin-Komponente eine Aminosäure oder ein Peptid ist, deren übrige Carboxy- und/oder Amino-Gruppen geschützt sind.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass

a) die Säure-Komponente und die Amin-Komponente gleiche oder verschiedene Aminosäuren sind,

b) die Säure-Komponente eine Aminosäure und die Amin-Komponente ein Peptid ist oder

c) die Amin-Komponente eine Aminosäure und die Säure-Komponente ein Peptid ist,

wobei über die mindestens eine Carboxy-Gruppe und die mindestens eine primäre oder sekundäre Amino-Gruppe hinaus vorhandene weitere Carboxy- bzw. primäre oder sekundäre Amino-Gruppen geschützt sind.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Amino-Gruppe der Amin-Komponente eine sekundäre Amino-Gruppe und/oder die an das

- 5 α -C-Atom der Säure-Komponente gebundene Aminogruppe eine tertiäre Amino-Gruppe ist, insbesondere die Amino-Gruppe der Amin-Komponente und die geschützte oder peptidisch verknüpfte Aminogruppe der Säure-Komponente beide *N*-alkyliert sind, vorzugsweise unabhängig voneinander *N*-alkyliert mit einer Methyl-, Ethyl-, Propyl-, iso-Propyl-, Cyclohexyl- oder Benzylgruppe.
- 10 5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Amin-Komponente oder die Säure-Komponente reversibel an eine feste Phase gebunden ist, vorzugsweise an ein Harz, insbesondere an ein Trityl-Harz, Wang-Polystyrol-Harz oder Rink-Amid-MBHA-Harz und besonders bevorzugt an TCP-Harz.
- 15 6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Säure-Komponente und die Amin-Komponente in einem Verhältnis, bezogen auf die Stoffmenge, von mindestens 1 zu 1, vorzugsweise von 1 zu 1 bis 10 zu 1, insbesondere von 1 zu 1 bis 5 zu 1, eingesetzt werden.
- 20 7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Säure-Komponente und das Aktivierungsreagenz in einem Verhältnis, bezogen auf die Stoffmenge, von mindestens 1 zu 1, vorzugsweise von 1 zu 1 bis 4 zu 1, insbesondere von 2 zu 1 bis 3 zu 1, eingesetzt werden.
- 25 8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Kupplungsbase und/oder die Aktivierungsbase gemäß (ii) in einem Verhältnis zur Amin-Komponente, bezogen auf die Stoffmenge, von mindestens 2 zu 1, vorzugsweise von 4 zu 1 bis 30 zu 1, insbesondere von 8 zu 1 bis 20 zu 1, besonders bevorzugt von 12 zu 1 bis 16 zu 1, eingesetzt werden.
- 30

9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Aktivierungsreagenz

5 ein Carbonat der Formel I, in der eine oder beide Gruppen X unabhängig voneinander für eine Gruppe $\text{CH}_{3-n}\text{Y}_n$ stehen, wobei n für eine der Zahlen 1, 2 oder 3 und Y_n für ein, zwei oder drei gleiche oder verschiedene Halogenatome steht, stehen, insbesondere für eine der Gruppen CCl_3 , CF_3 , CBr_3 , CHCl_2 , CHF_2 , CHBr_2 , CHI_2 , CH_2Cl , CH_2F oder CH_2Br , oder

10 ein halogeniertes 1,3-Dioxolan-2-nderivat, dessen vier Wasserstoffatome in 4- und 5-Position ganz oder teilweise durch ein, zwei, drei oder vier gleiche oder verschiedene Halogenatome substituiert sind, oder

15 ein Monohalogenid der Formel II, in der X für eine Gruppe $\text{CH}_{3-n}\text{Y}_n$ steht, wobei n für eine der Zahlen 1, 2 oder 3 und Y_n für ein, zwei oder drei gleiche oder verschiedene Halogenatome steht, stehen, oder

ein Dihalogenid der Formel III,

20 vorzugsweise Triphosgen, Diphosgen, Phosgen und/oder 4,4,5,5-Tetrachlor-1,3-dioxolan-2-on,

besonders bevorzugt Triphosgen eingesetzt wird.

25 10. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Kupplungsbase und die Aktivierungsbase unabhängig voneinander ausgewählt sind

30 aus der Gruppe umfassend Pyridin und die ein- oder mehrfach alkylsubstituierten Pyridinderivate, vorzugsweise aus den Collidinen, 2,4,6-Tritert-

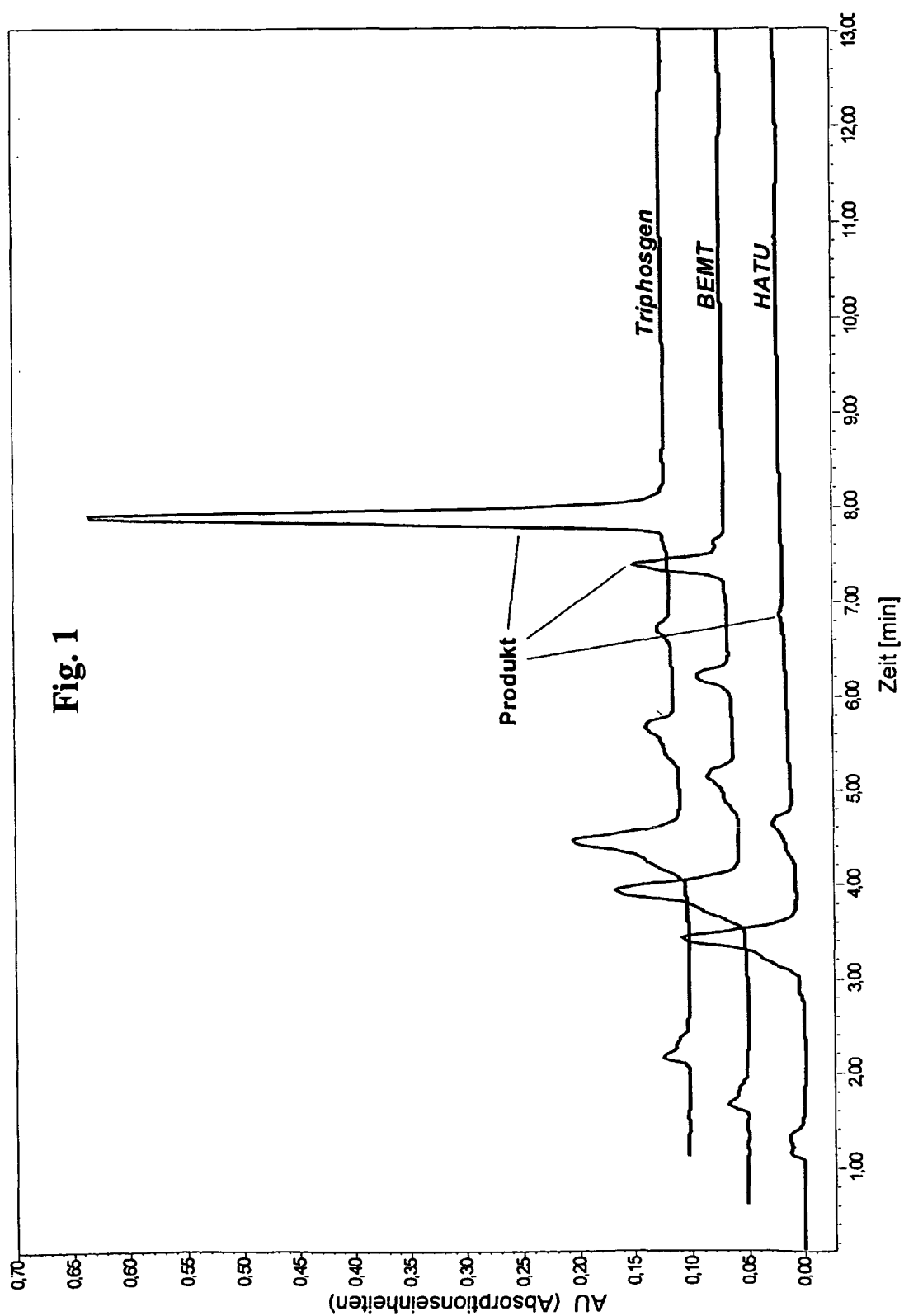
butylpyridin, 2,6-Ditert-butylpyridin, 2,6-Ditert-butyl-4-methylpyridin, 2,6-Dimethylpyridin, 2,3,5,6-Tetramethylpyridin, 2-Methylpyridin, Pyridin, oder

aus der Gruppe der Trialkylamine, vorzugsweise aus Diisopropylethylamin, Triisopropylamin, *N*-Methylmorpholin, Triethylamin.

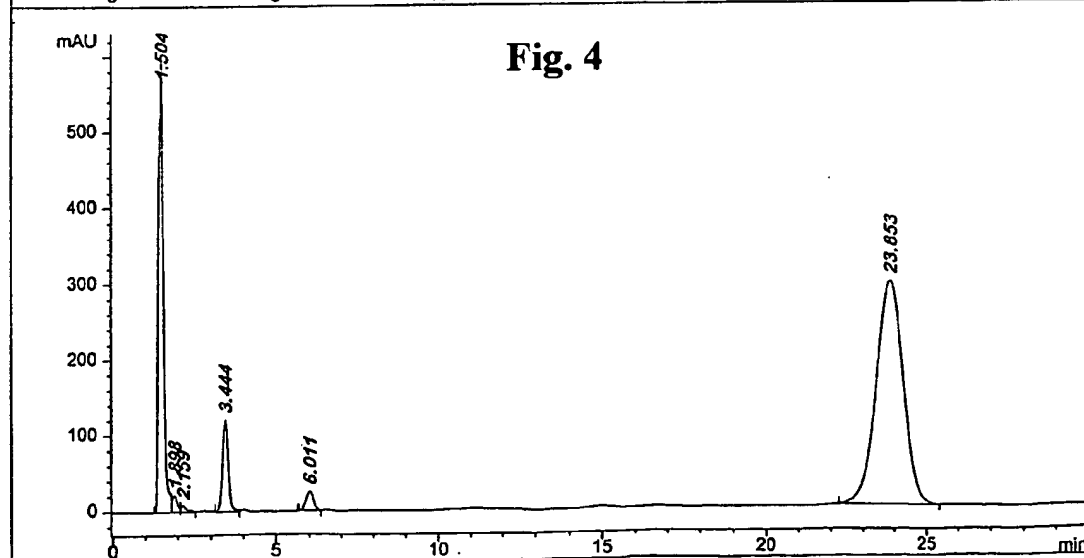
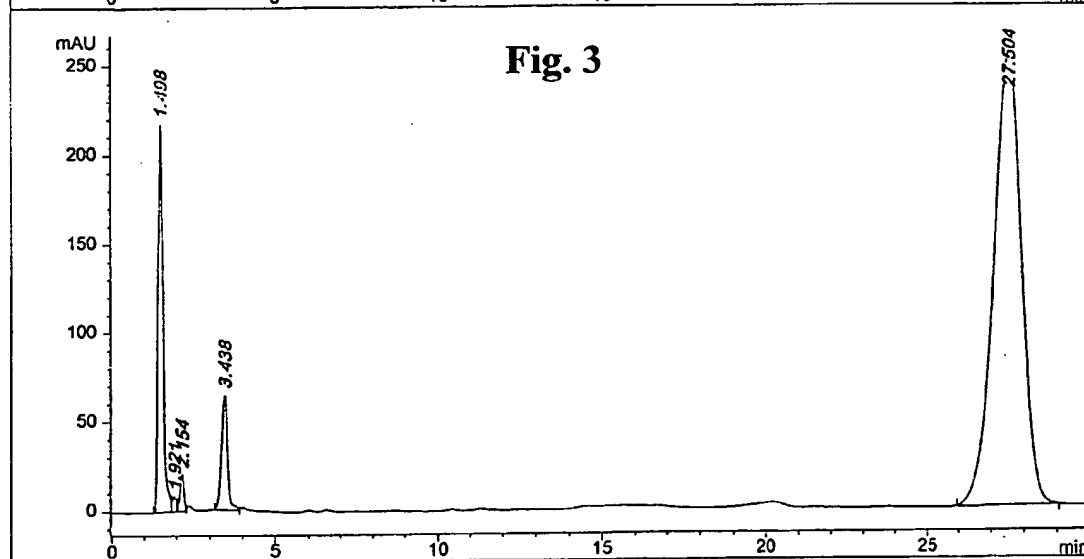
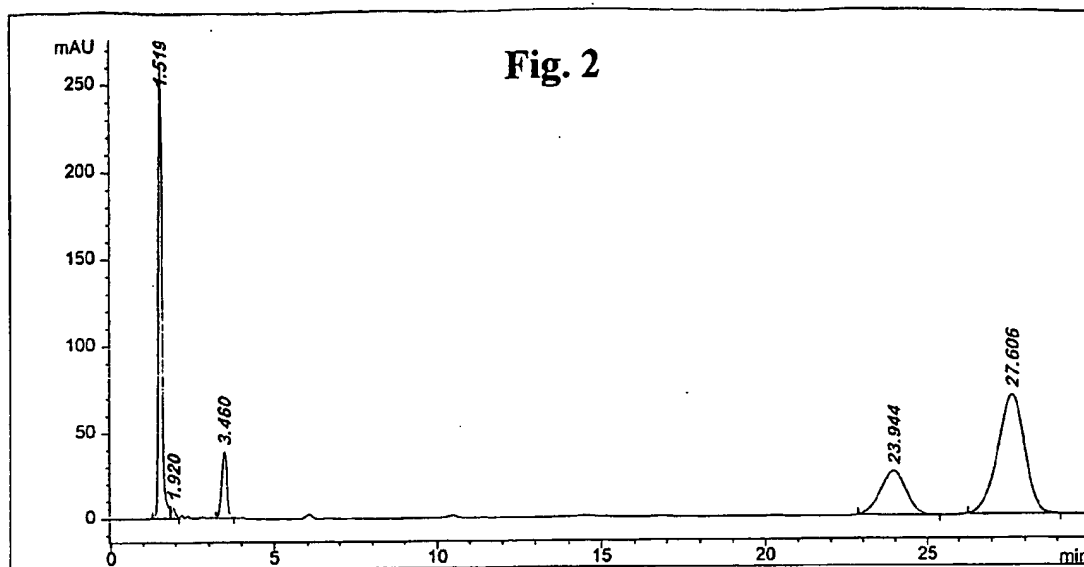
11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Kupplungsbase 2,4,6-Collidin, Pyridin, Triethylamin oder ein sterisch gehindertes Trialkylamin ist, vorzugsweise ein sterisch gehindertes Trialkylamin, insbesondere Diisopropylethylamin oder Triisopropylamin, besonders bevorzugt Diisopropylethylamin.
12. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Aktivierungsbase ein sterisch gehindertes ein- oder mehrfach alkylsubstituiertes Pyridinderivat ist, vorzugsweise 2,4,6-Collidin, 2,4,6-Tritert-butylpyridin, 2,6-Ditert-butylpyridin, 2,6-Ditert-butyl-4-methylpyridin, 2,6-Dimethylpyridin oder 2,3,5,6-Tetramethylpyridin, besonders bevorzugt 2,4,6-Collidin.
13. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösungsmittel gemäß (i) und (ii) unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Tetrahydrofuran, 1,4-Dioxan, Tetrahydropyran, Ethylenglykoldimethylether, Diethylenglykoldimethylether, Trichlormethan, 1,3-Dichlorpropan, 1,2-Dichlorethan, Nitromethan oder ein Gemisch zweier oder mehrerer davon, vorzugsweise Tetrahydrofuran, 1,4-Dioxan, Tetrahydropyran, Ethylenglykoldimethylether oder Diethylenglykoldimethylether oder ein Gemisch zweier oder mehrerer davon, insbesondere Tetrahydrofuran.
14. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 bei der Herstellung biologisch aktiver *N*-Alkylamide.

15. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Herstellung biologisch aktiver *N*-Alkylamide.
- 5 16. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Herstellung *N*-methylierter cyclopeptidischer biologisch aktiver Naturstoffe, vorzugsweise von Cyclosporinen, Tentoxinen, Dolastatinen, Jaspamiden, Didemniden und Nodularinen, insbesondere von Cyclosporin O und Omphalotin A.
- 10 17. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Herstellung von Peptiden, die anstelle einer oder mehrerer nicht-*N*-alkylsubstituierter Aminosäuren eine oder mehrere *N*-Methylaminosäuren aufweisen, für den Einsatz in einem Funktionalitätsscreening.

- 1/15 -

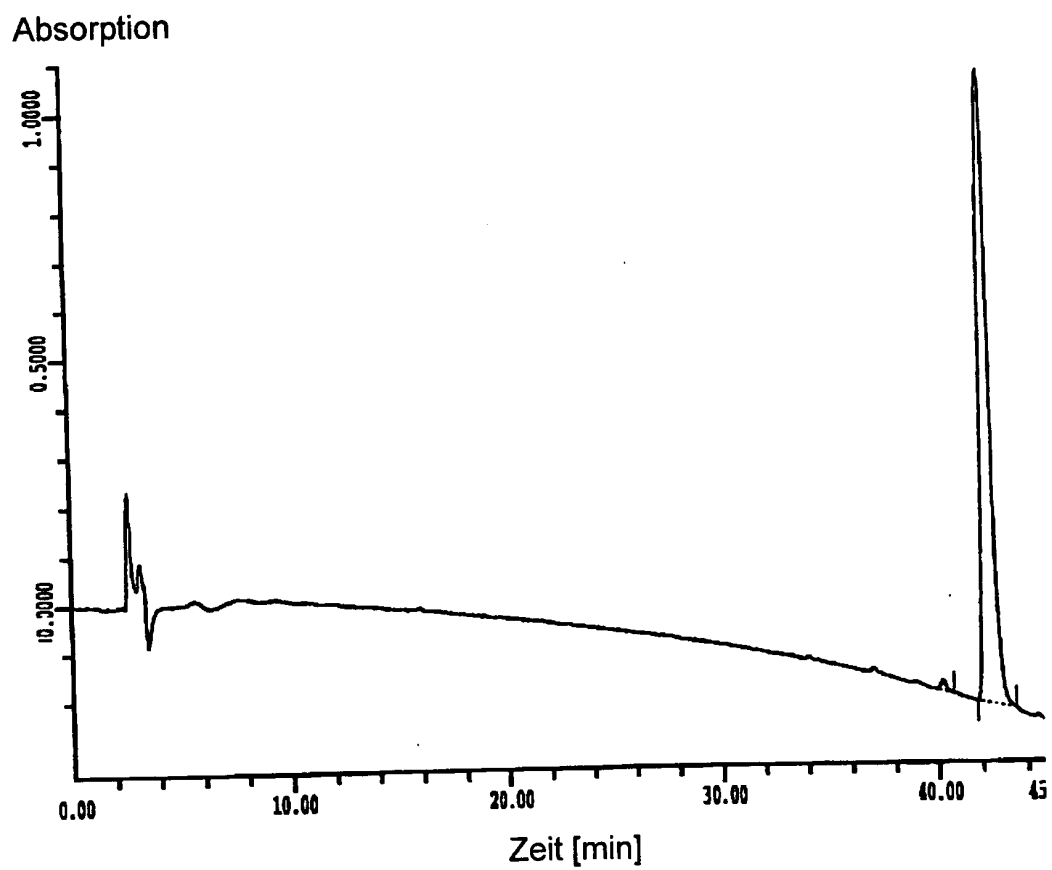


- 2/15 -

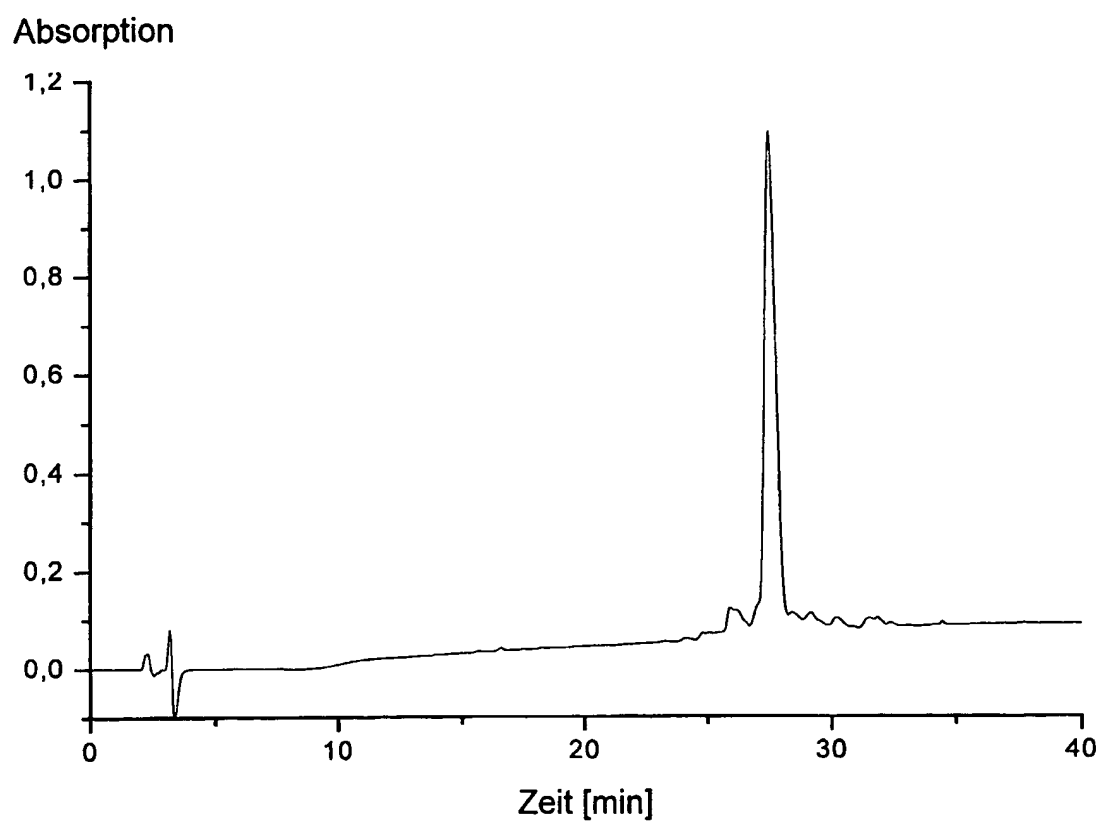


- 3/15 -

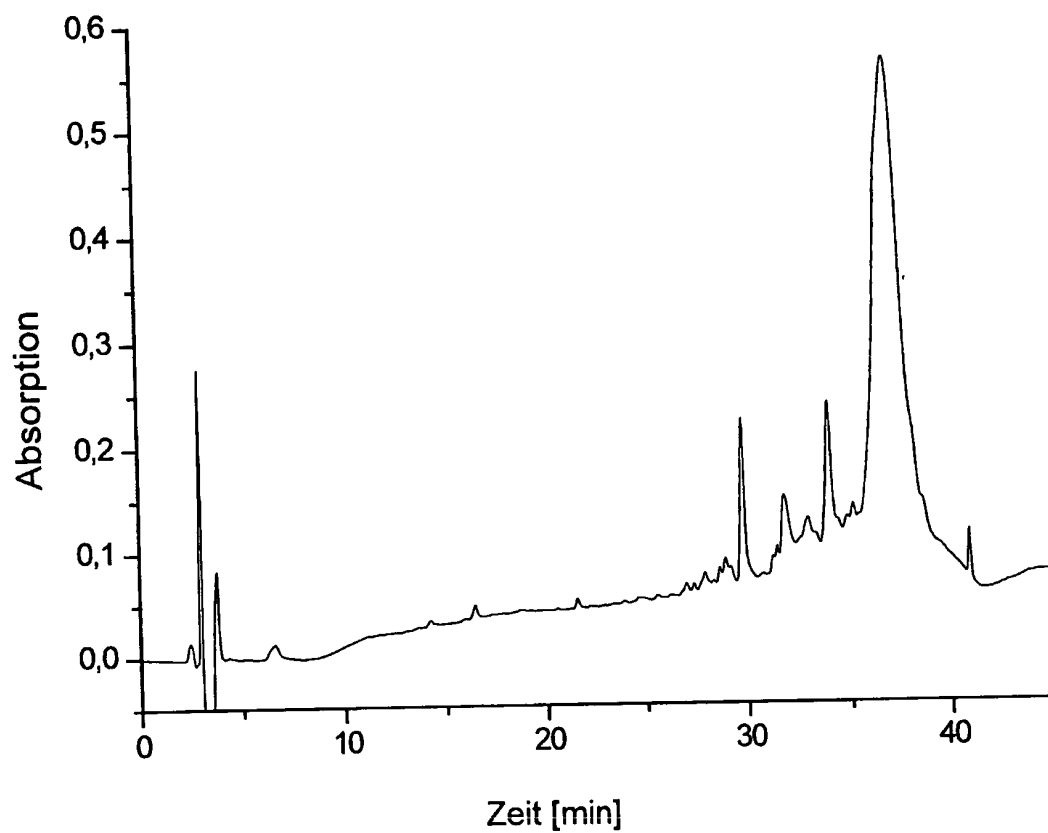
Fig. 5



- 4/15 -

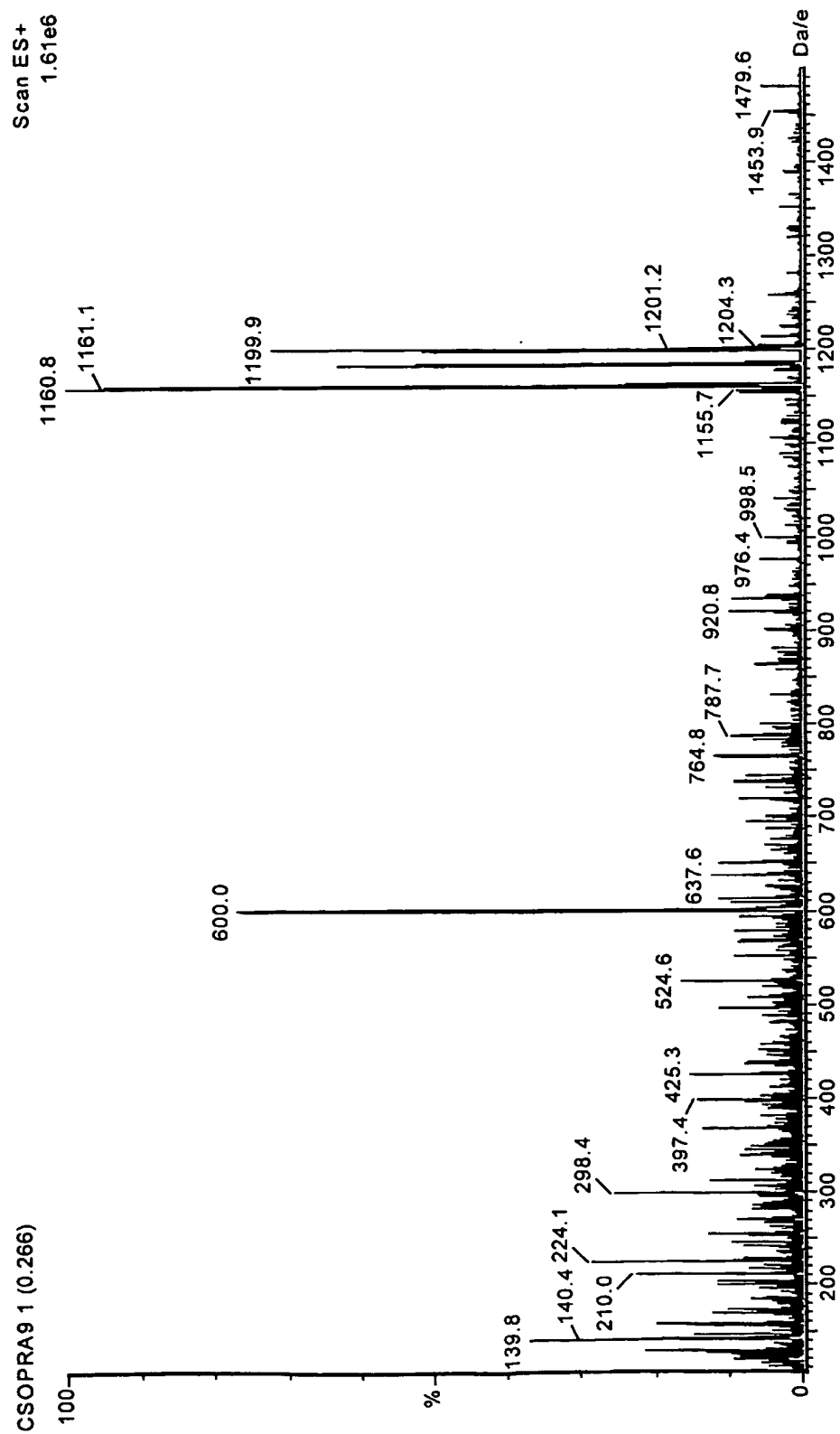
Fig. 6

- 5/15 -

Fig. 7

- 6/15 -

Fig. 8



- 7/15 -

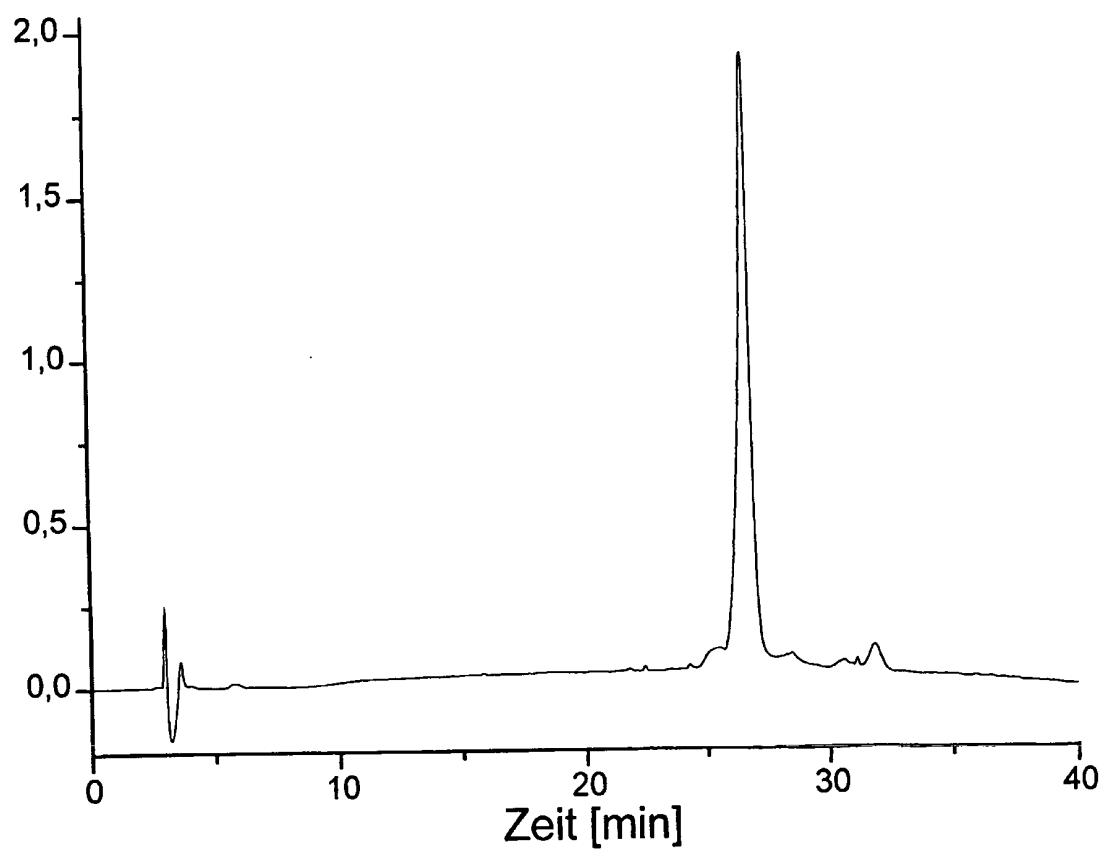
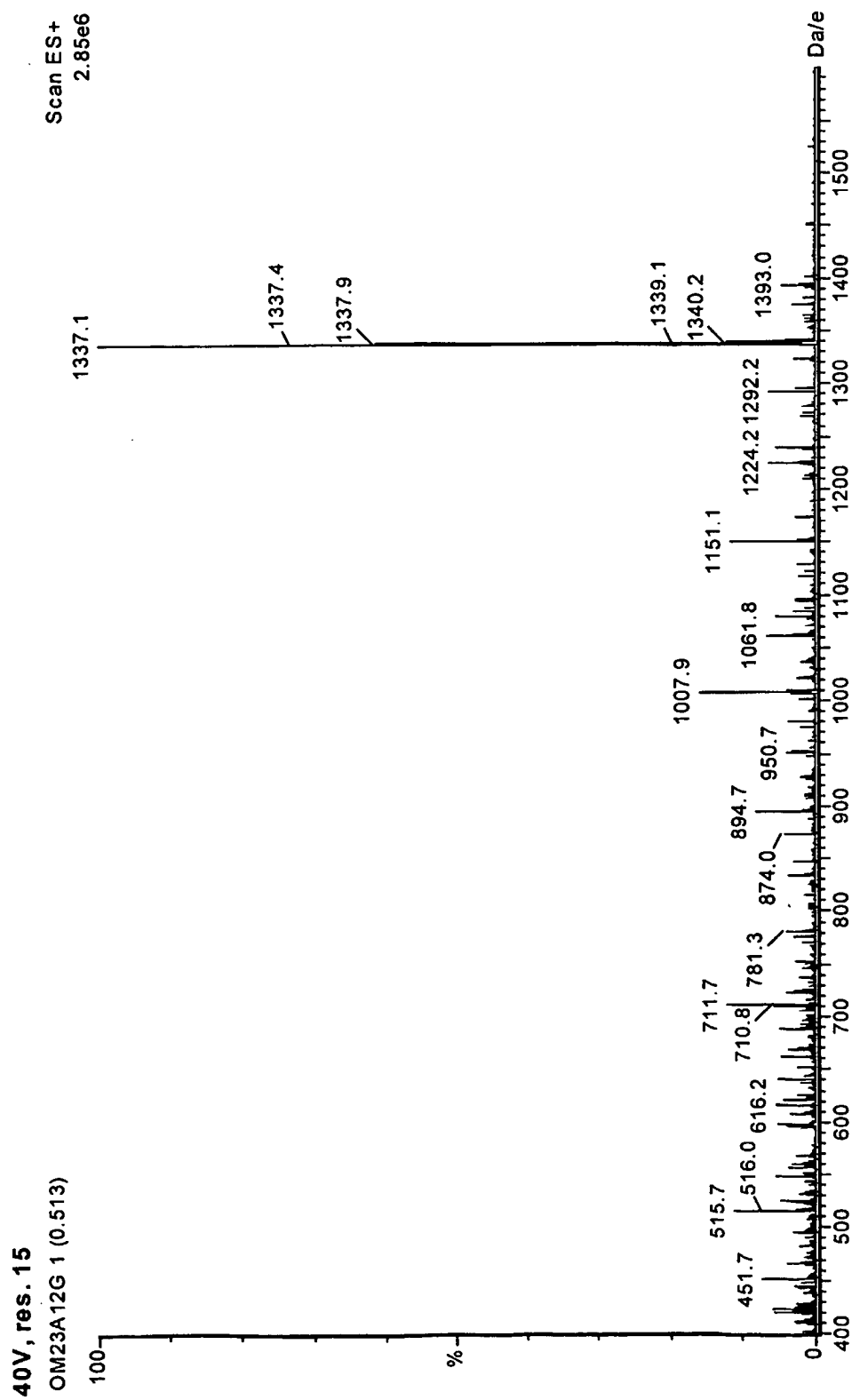
Fig. 9**Absorption**

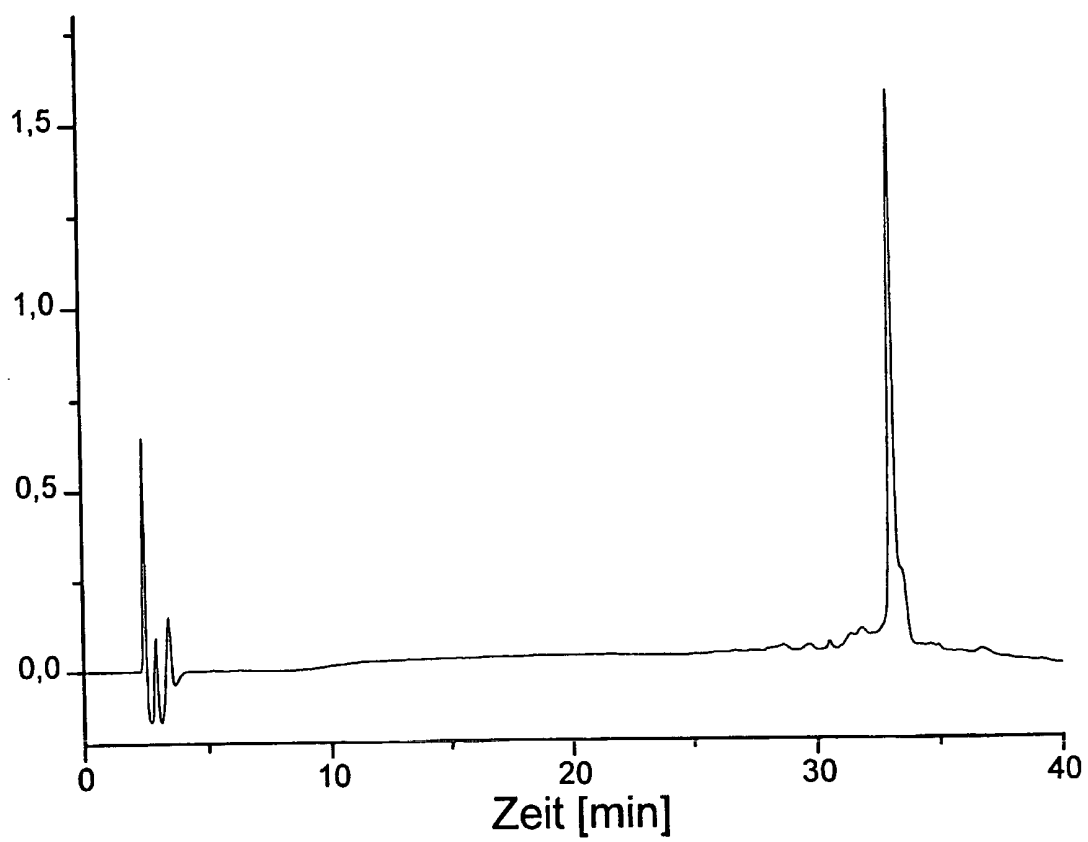
Fig. 10



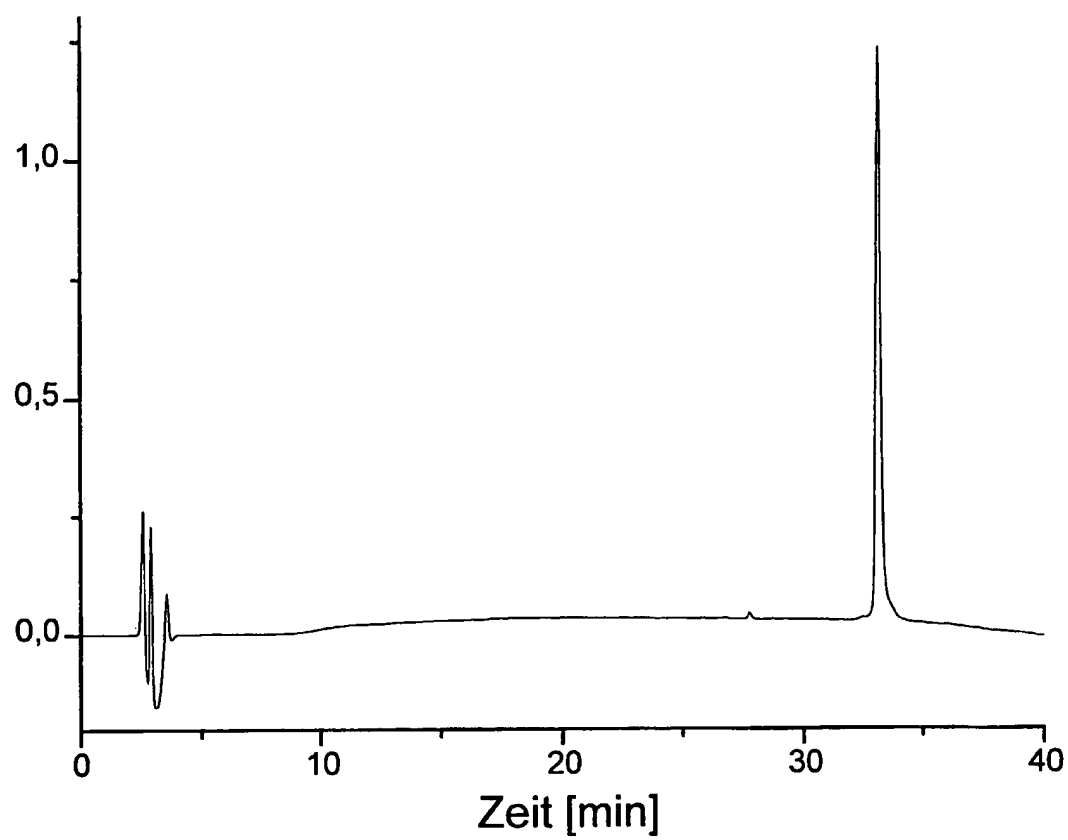
- 9/15 -

Fig. 11

Absorption



- 10/15 -

Fig. 12**Absorption**

- 11/15 -

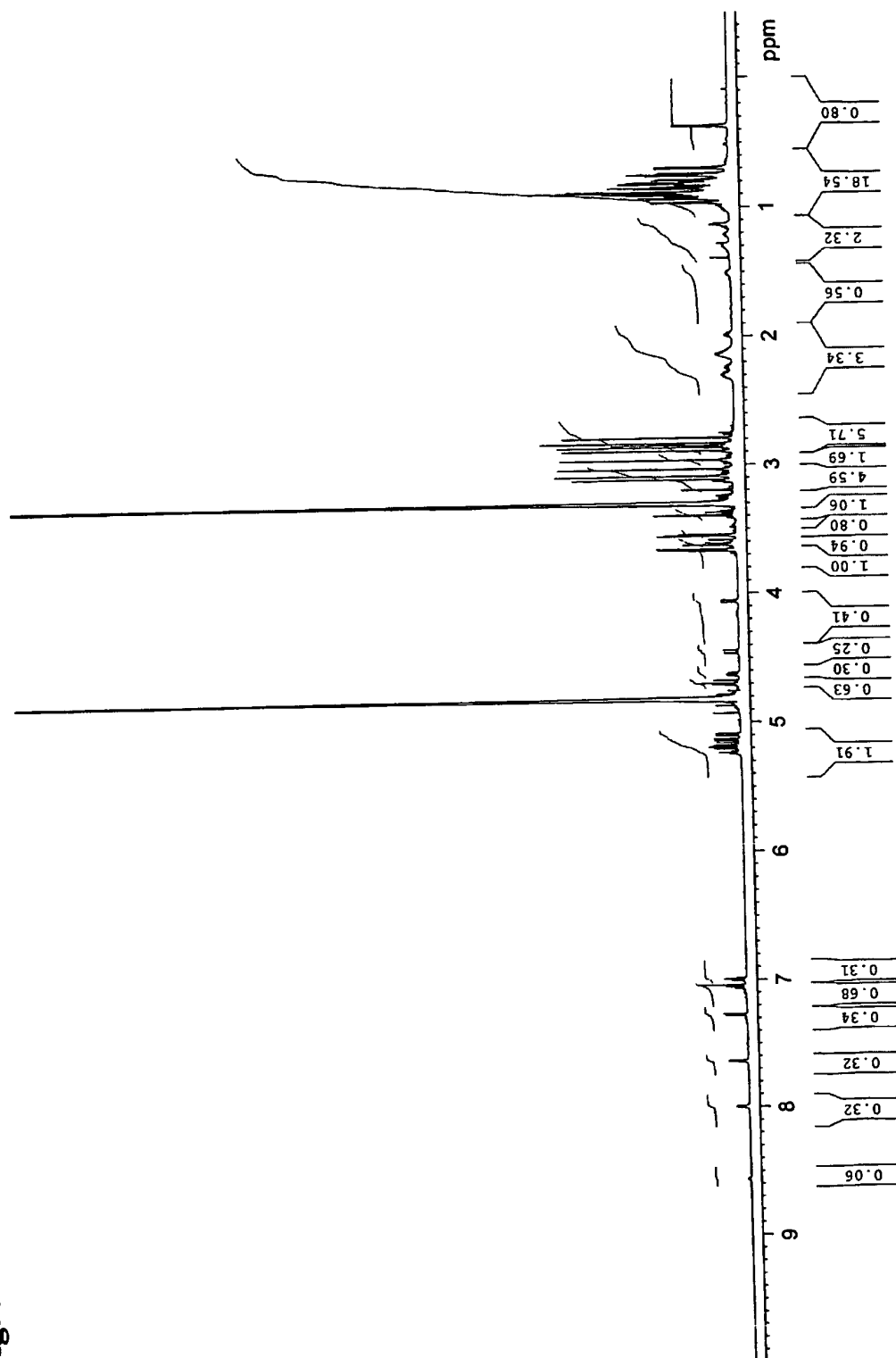
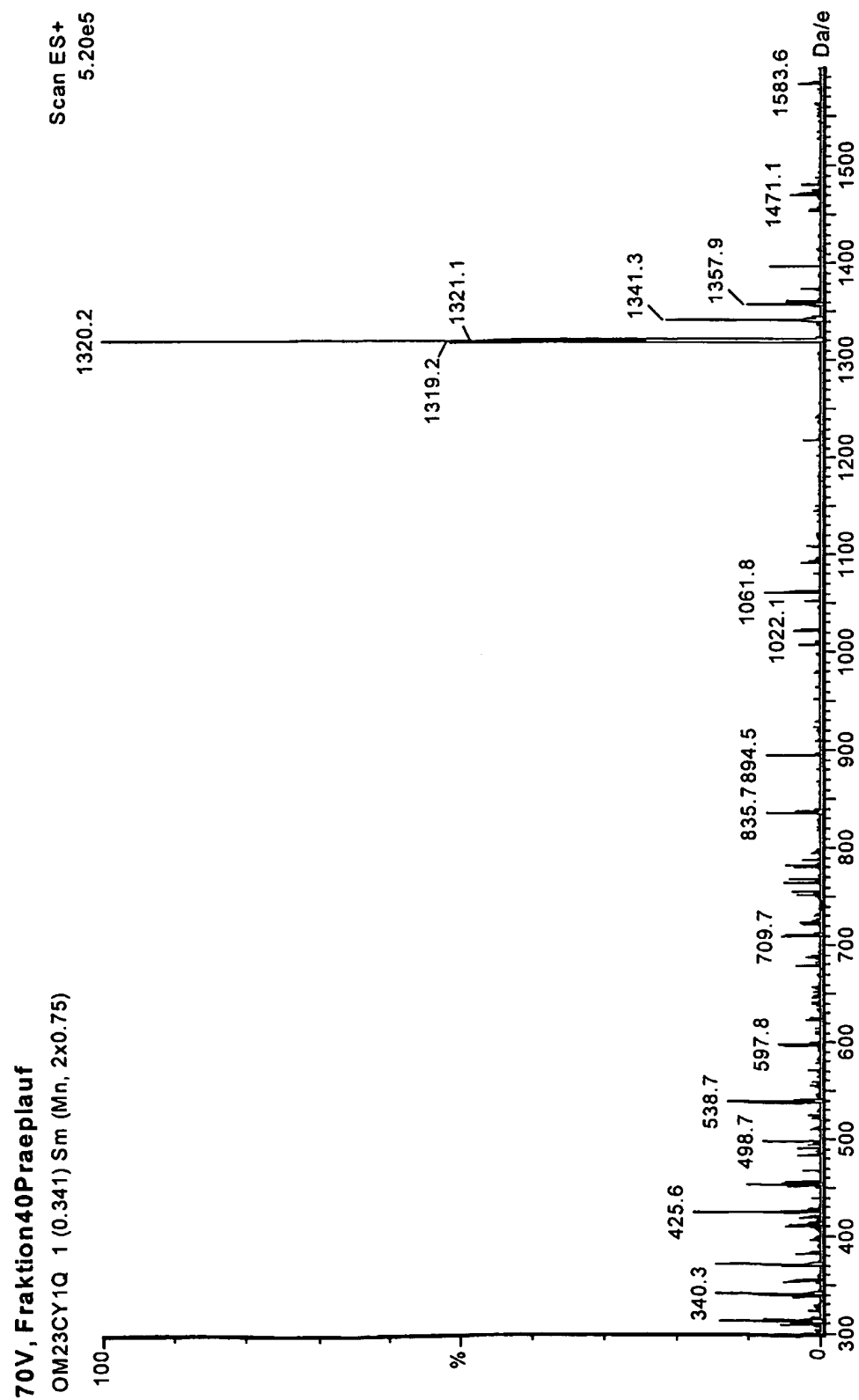


Fig. 13

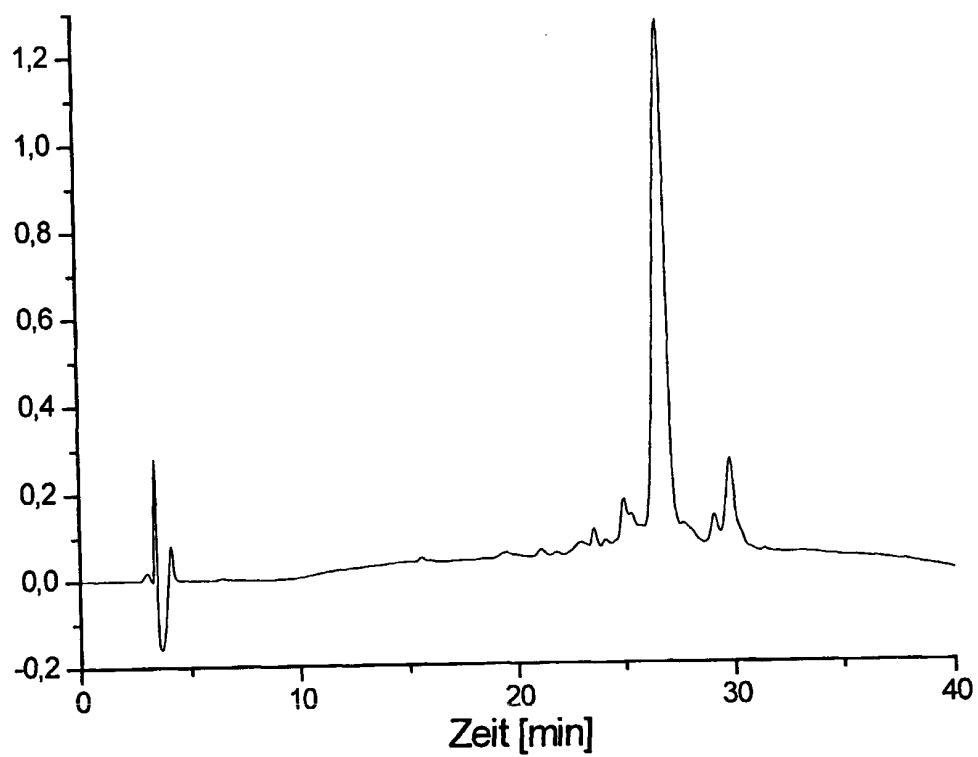
- 12/15 -

Fig. 14

- 13/15 -

Fig. 15

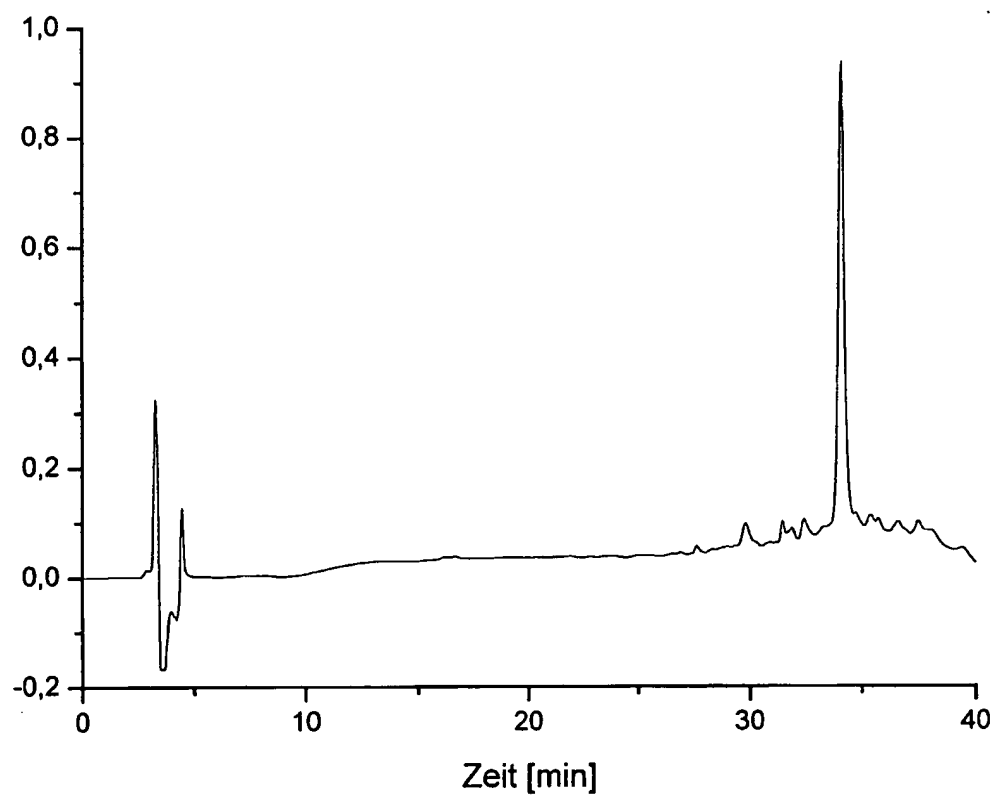
Absorption



- 14/15 -

Fig. 16

Absorption



- 15/15 -

Fig. 17